

ISSN 1726-9784



# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal  
of Biotherapy**

**3**

ТОМ 17  
2018





Зарегистрирован по показанию:

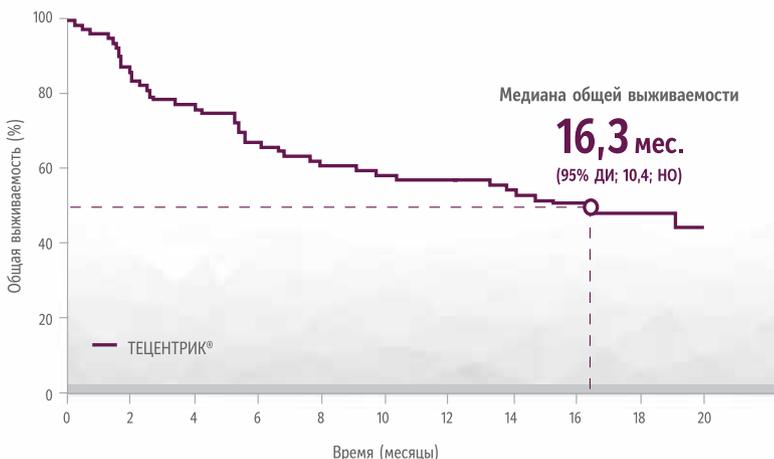
**МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННЫЙ ИЛИ МЕТАСТАТИЧЕСКИЙ УРОТЕЛИАЛЬНЫЙ РАК ПРИ НЕВОЗМОЖНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ЦИСПЛАТИНОМ ИЛИ ПОСЛЕ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕЙ ХИМИОТЕРАПИИ**



**ПРИ НАЛИЧИИ ЛЮБОГО КЛИНИЧЕСКОГО КРИТЕРИЯ ТЕРАПИЯ ЦИСПЛАТИНОМ НЕ ПОКАЗАНА**

- ✗ Клиренс креатинина <60 мл/мин. (1 мл/сек.)
- ✗ ECOG ≥2 или индекс Карновского ≤70%
- ✗ Сердечная недостаточность III класс по NYHA
- ✗ Периферическая нейропатия ≥2 степени (СТСАЕ версия 4)
- ✗ Потеря слуха ≥2 степени (СТСАЕ версия 4)

**ТЕЦЕНТРИК® УВЕЛИЧИВАЕТ МЕДИАНУ ОБЩЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ДО 16,3 МЕСЯЦА У ПАЦИЕНТОВ ПРИ НЕВОЗМОЖНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ЦИСПЛАТИНОМ НЕЗАВИСИМО ОТ PD-L1 СТАТУСА**



**ТЕЦЕНТРИК® В ПЕРВОЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ ПРИ НЕВОЗМОЖНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ЦИСПЛАТИНОМ**

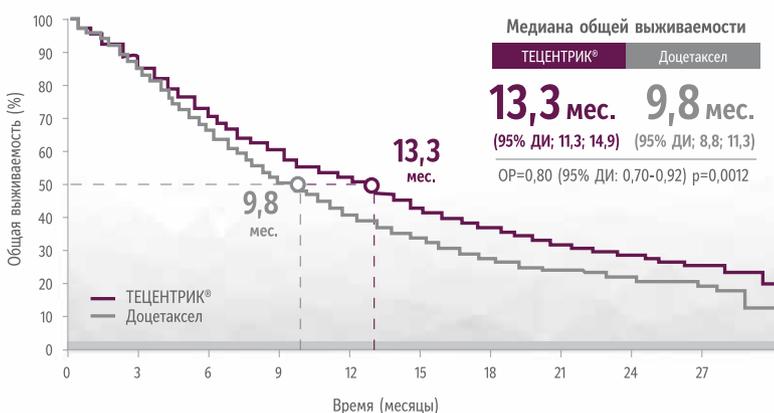
- ▶ Обеспечивает медиану длительности ответа более 29,3 месяца
- ▶ Увеличивает медиану общей выживаемости до 16,3 месяца у пациентов независимо от PD-L1 статуса
- ▶ Обеспечивает контроль над заболеванием в 30% случаев
- ▶ Обеспечивает 1-летнюю выживаемость 58% и 2-летнюю выживаемость 41%
- ▶ Показал благоприятный профиль безопасности
- ▶ Имеет простую и удобную для врача и пациента схему введения фиксированной дозы препарата 1 раз в 3 недели

Зарегистрирован по показанию:

**МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННЫЙ ИЛИ МЕТАСТАТИЧЕСКИЙ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫЙ РАК ЛЕГКОГО ПОСЛЕ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕЙ ХИМИОТЕРАПИИ**



**ТЕЦЕНТРИК® ВО ВТОРОЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ НМРЛ УВЕЛИЧИВАЕТ МЕДИАНУ ОБЩЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ДО 13,3 МЕСЯЦА**

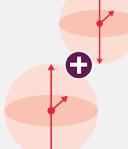
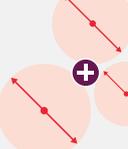


**ТЕЦЕНТРИК® ВО ВТОРОЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ НМРЛ**

- ▶ Увеличивает медиану длительности ответа на терапию до 23,9 месяца независимо от PD-L1 статуса
- ▶ Увеличивает медиану общей выживаемости до 13,3 месяца
- ▶ Обеспечивает объективный ответ и стабилизацию заболевания у 49% пациентов
- ▶ Более безопасен и легче переносится по сравнению со стандартной химиотерапией второй линии
- ▶ Имеет простую и удобную для врача и пациента схему введения фиксированной дозы препарата 1 раз в 3 недели

# СИСТЕМЫ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ ОТВЕТА СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИММУНООНКОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

## СРАВНЕНИЕ RECIST 1.1, IRRC И IRECIST

|   | RECIST 1.1   | IrRC  | IrRECIST   |
|---|--|---|--|
| <b>ИЗМЕРЯЕМЫЙ ОЧАГ</b>                    | Одномерный, наибольший диаметр (см), $\geq 10$ мм<br>   | Двумерный, наибольший диаметр + перпендикуляр (см), $\geq 5 \times 5$ мм<br>  | Одномерный, наибольший диаметр (см), $\geq 10$ мм<br>   |
| <b>ОТНОШЕНИЕ К ПОЯВЛЕНИЮ НОВЫХ ОЧАГОВ</b> | Прогрессирование<br>  | Не является прогрессированием, требует подтверждения через 4 недели<br>   | Не является прогрессированием, требует подтверждения через 4 недели<br>   |
| <b>ЧТО ОЦЕНИВАЕТСЯ?</b>                   | Сумма наибольших диаметров целевых очагов<br>   | Сумма произведений 2 наибольших перпендикулярных размеров целевых и новых очагов<br>  | Сумма наибольших диаметров (целевых и новых очагов)<br>   |
| <b>ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТА</b>                  | ПО – исчезновение всех очагов<br><br>ЧО – уменьшение на $\geq 30\%$<br><br>ПЗ – увеличение на $\geq 20\%$<br> | ПО – исчезновение всех очагов<br><br>ЧО – уменьшение на $\geq 50\%$<br><br>ПЗ – увеличение на $\geq 25\%$<br> | ПО – исчезновение всех очагов<br><br>ЧО – уменьшение на $\geq 30\%$<br><br>ПЗ – увеличение на $\geq 20\%$<br> |

ДИ – доверительный интервал; НО – не оценено; IRECIST – (Immunie-related response evaluation criteria in solid tumors) критерии оценки ответа солидных опухолей на иммунотерапию; IRRC – (immune-related response criteria) критерии оценки ответа на иммунотерапию; ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group; CTCAE – Common Terminology Criteria for Adverse Events; NYHA – New York Heart Association; ПО – полный ответ; ЧО – частичный ответ; ПЗ – прогрессирование заболевания.

Galinsky MD, et al. Lancet Oncol 2011; Balar A.V. et al. J Clin Oncol 36, 2018 (suppl); abstr 4523 ASCO; Balar, et al. ASCO 2016 (Abstr LBA4500); Balar A. et al. Lancet 2017; Vol. 389: 67-76 January 2017; Barlesi, et al. ESMO 2016 (Abs LBA44); Rittmeyer, et al. Lancet 2017; Fehrenbacher L. et al., Journal of Thoracic Oncology 2018; Инструкция по медицинскому применению препарата Тецентрик®; Юдин Д.И. и др. Системы критериев оценки ответа солидных опухолей при лечении иммуноонкологическими препаратами. Журнал «Злокачественные опухоли» № 1 2017 г. (22)

### Краткая инструкция по медицинскому применению препарата Тецентрик® (Концентрат для приготовления раствора для инфузий)

**Показания к применению.** Местнораспространенный или метастатический уротелиальный рак после предшествующей химиотерапии или при невозможности лечения цисплатином. Местнораспространенный или метастатический немелкоклеточный рак легкого после предшествующей химиотерапии. **Противопоказания:** Гиперчувствительность к атезолизумабу или любому компоненту препарата в анамнезе. Беременность и период грудного вскармливания. Детский возраст до 18 лет (эффективность и безопасность применения препарата Тецентрик® у детей и подростков <18 лет не изучались). **С осторожностью.** Нарушение функции печени средней или тяжелой степени тяжести. Аутоиммунные заболевания. Нарушение функции почек тяжелой степени тяжести. **Способ применения и дозы.** Рекомендуемая доза препарата Тецентрик® составляет 1200 мг в виде в/в инфузии каждые 3 недели. Первую дозу препарата Тецентрик® необходимо вводить в течение 60 минут. При хорошей переносимости первой инфузии все последующие инфузии можно проводить в течение 30 минут. **Побочное действие.** Следующие нежелательные реакции, связанные с препаратом Тецентрик®, возникали у  $\geq 10\%$  пациентов. **Нарушения со стороны обмена веществ:** снижение аппетита; **Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения:** одышка; **Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта:** диарея, тошнота, рвота; **Нарушения со стороны кожи и подкожных тканей:** сыпь, зуд; **Нарушения со стороны костно-мышечной и соединительной ткани:** артралгия; **Общие расстройства и нарушения в месте введения:** повышенная утомляемость, астения, лихорадка. **Описание отдельных нежелательных реакций** (возникли у  $\geq 1\%$  пациентов). Развитие иммуноопосредованного пневмонита наблюдалось у 3.1% пациентов с метастатическим уротелиальным раком (МУР) и немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), получавших препарат Тецентрик®. Развитие иммуноопосредованного колита наблюдалось у 1.1% пациентов с МУР и НМРЛ. Развитие иммуноопосредованного гипотиреоза наблюдалось у 4.7% пациентов с МУР и НМРЛ, гипертиреоза у 1.7% пациентов с МУР и НМРЛ. **Дополнительная информация:** Женщины с сохранной репродуктивной функцией должны использовать эффективные методы контрацепции и принимать активные меры для предотвращения беременности в период лечения препаратом Тецентрик® и в течение минимум 5 месяцев после последней инфузии препарата. Применение препарата Тецентрик® может оказывать отрицательное воздействие на плод в силу механизма действия. Исследования на животных показали, что ингибирование пути PD-L1/PD-1 может приводить к повышенному риску иммуноопосредованного отторжения развивающегося плода и его гибели. Необходимо проинформировать беременную женщину о наличии риска для плода. Клинические исследования препарата Тецентрик® у беременных женщин не проводились. Препарат Тецентрик® не следует применять во время беременности. Влияние препарата на образование грудного молока или присутствие препарата Тецентрик® в грудном молоке не исследовались. Поскольку возможность отрицательного воздействия на ребенка, находящегося на грудном вскармливании, неизвестна, следует прекратить либо грудное вскармливание, либо применение препарата Тецентрик®. **Регистрационное удостоверение:** ЛП-004652 от 18.01.2018 г. **Полная информация о препарате Тецентрик® (Концентрат для приготовления раствора для инфузий) представлена в инструкции по медицинскому применению. О нежелательных реакциях при применении препарата Тецентрик®, а также в случае наступления беременности во время лечения препаратом Тецентрик® или в течение 5 месяцев после последней дозы препарата просим немедленно сообщить об этом в группу безопасности лекарственных средств Рош по телефону +7 (495) 229-29-99, через сайт [www.roche.ru](http://www.roche.ru) или по электронной почте [moscow.ds@roche.com](mailto:moscow.ds@roche.com)**

ЗАО «Рош-Москва»  
Официальный дистрибьютор  
«Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.» (Швейцария)  
Россия, 107031 г. Москва  
Трубная площадь, дом 2  
МФК «Галерея Неглинная»  
Тел.: +7 (495) 229-29-99  
Факс: +7 (495) 229-79-99  
[www.roche.ru](http://www.roche.ru)



Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

С 2016 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

# Российский Биотерапевтический Журнал

## Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

### УЧРЕДИТЕЛИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей

### ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

**З.С. Шпрах**, канд. фарм. наук

### ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

**А.В. Караулов**, академик РАН, д-р мед. наук, проф.;

**М.А. Барышникова**, канд. фарм. наук

### РЕДКОЛЛЕГИЯ

**И.А. Балдуева**, д-р мед. наук (Санкт-Петербург, Россия); **О.А. Бочарова**, д-р биол. наук, проф. (Москва, Россия); **Н.Д. Бунятян**, д-р фарм. наук, проф. (Москва, Россия); **А.К. Голенков**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **М.И. Давыдов**, д-р мед. наук, проф., академик РАН (Москва, Россия); **Л.В. Демидов**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **М.В. Дмитриева**, канд. фарм. наук, *ответственный секретарь* (Москва, Россия); **И.В. Евсегнеева**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **П.К. Иванов**, д-р мед. наук (Москва, Россия); **З.Г. Кадагидзе**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **В.П. Краснов**, д-р хим. наук, проф. (Екатеринбург, Россия); **И.Ю. Кубасова**, канд. мед. наук (Москва, Россия); **И.Г. Меерович**, канд. биол. наук (Омаха, Небраска, США); **А.В. Мисюрин**, канд. биол. наук (Москва, Россия); **И.Р. Набиев**, д-р хим. наук, проф. (Реймс, Франция); **В.В. Новиков**, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород, Россия); **Н.А. Оборотова**, д-р фарм. наук, проф. (Москва, Россия); **А.Ю. Петров**, д-р фарм. наук, проф. (Екатеринбург, Россия); **Н.Я. Рапопорт**, д-р хим. наук, проф. (Солт-Лейк-Сити, Юта, США); **В.В. Решетникова**, канд. техн. наук (Москва, Россия); **Н.С. Сергеева**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **Е.В. Степанова**, д-р мед. наук (Москва, Россия); **Н.Н. Тупицын**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **Е.Г. Турнянская**, канд. мед. наук (Москва, Россия); **Ю.В. Шишкин**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **И.Ж. Шубина**, д-р биол. наук (Москва, Россия); **И.В. Уласов**, д-р биол. наук (Сиэтл, США); **Р.И. Якубовская**, д-р биол. наук, проф. (Москва, Россия)

**3** ТОМ 17  
**'18**

ОСНОВАН В 2002 г. ПРОФЕССОРОМ А.Ю. БАРЫШНИКОВЫМ

115478 Москва, Каширское ш., 24  
ФГБУ «НМИЦ онкологии  
им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России,  
НИИ экспериментальной  
диагностики и терапии опухолей  
Тел.: +7 (499) 324-10-65,  
+7 (499) 612-81-92;  
факс +7 (499) 324-22-74

E-mail: bioterapy\_rbj@mail.ru  
rbjournal@ronc.ru

**Адрес редакции:**  
115478, Москва,  
Каширское шоссе, 24,  
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.  
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19  
e-mail: abv@abvpress.ru  
[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

*Редактор Е.П. Врублевская  
Корректор Т.Н. Помилуйко  
Дизайн Е.В. Степанова  
Верстка О.В. Гончарук*

*Журнал зарегистрирован  
в Федеральной службе по надзору  
в сфере связи, информационных  
технологий и массовых коммуникаций.  
Регистрационный номер:  
№ 77-11695 от 21.01.2002 г.,  
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013 г.  
При полной или частичной  
перепечатке материалов  
ссылка на журнал «Российский  
биотерапевтический журнал»  
обязательна.*

ISSN 1726-9784  
Российский биотерапевтический  
журнал. 2018. Том 17. № 3. 1–90  
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018  
Подписной индекс в каталоге  
агентства «Роспечать» – 81679  
Отпечатано в типографии  
ООО «Тверской Печатный Двор»  
Тираж 1000 экз.  
[http://www.ronc.ru/specialists/usefull/  
journals/138/](http://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/)  
<http://bioterapevt.elpub.ru/jour/index>



The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses). In 2016, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

# Russian Journal of Biotherapy

PEER-REVIEWED THEORETICAL AND SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

## FOUNDERS

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors

## EDITOR-IN-CHIEF

**Z.S. Shprakh**, PhD

## DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

**A.V. Karaulov**, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS (Moscow, Russia);

**M.A. Baryshnikov**, PhD (Moscow, Russia)

## EDITORIAL BOARD

**I.A. Baldueva**, PhD, DSc (Saint Petersburg, Russia); **O.A. Bocharova**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **N.D. Bunyatyan**, PhD, DSc, Professor (Moscow); **A.K. Golenkov**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **M.I. Davydov**, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS (Moscow, Russia); **L.V. Demidov**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **M.V. Dmitrieva**, PhD, *Executive Editor* (Moscow, Russia); **I.V. Evsegneeva**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **P.K. Ivanov**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **Z.G. Kadagidze**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **V.P. Krasnov**, PhD, DSc, Professor (Ekaterinburg, Russia); **I.Yu. Kubasova**, PhD (Moscow, Russia); **I.G. Meerovich**, PhD (Omaha, Nebraska, USA); **A.V. Misyurin**, PhD (Moscow, Russia); **V.V. Novikov**, PhD, DSc, Professor (Nizhny Novgorod, Russia); **I.R. Nabiev**, PhD, DSc, Professor (Reims, France); **N.A. Oborotova**, PhD, DSc, Professor (Moscow); **A.Yu. Petrov**, PhD, DSc, Professor (Ekaterinburg, Russia); **N.Ya. Rapoport**, PhD, DSc, Professor (Salt Lake City, Utah, USA); **V.V. Reshetnikova**, PhD (Moscow, Russia); **N.S. Sergeeva**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **E.V. Stepanova**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **N.N. Tupitsin**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **E.G. Turnyanskaya**, PhD (Moscow, Russia); **Yu.V. Shishkin**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **I.Zh. Shubina**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **I.V. Ulasov**, PhD (Seattle, USA); **R.I. Yakubovskaya**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2002 BY PROFESSOR A.YU. BARYSHNIKOV

**3** VOL. 17  
**'18**

FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center" of the Ministry of Health of Russia, Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors.  
Tel.: +7 (499) 324-10-65,  
+7 (499) 612-81-92.  
Fax: +7 (499) 324-22-74

e-mail: [biotherapy\\_rbj@mail.ru](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
[rbjournal@ronc.ru](mailto:rbjournal@ronc.ru)

### Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,  
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse,  
Build. 15, Moscow 115478.  
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19  
e-mail: [abv@abvpress.ru](mailto:abv@abvpress.ru)  
[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)  
Editor **E.P. Vrublevskaia**  
Proofreader **T.N. Pomiluyko**  
Designer **E.V. Stepanova**  
Maker-up **O.V. Goncharuk**

*The journal is registered at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media  
Registration number: ПИ № 77-11695  
dated 21.01.2002; ПИ № ФС77-53039  
dated 04.03.2013*

**If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal".**

ISSN 1726-9784  
Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2018. Volume 17. No 3. 1–90  
© PH "ABV-Press", 2018  
Rospechat catalogue index: 81679  
Printed at the Tverskoy Pechatny Dvor  
1,000 copies  
<https://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/>  
<http://bioterapevt.elpub.ru/jour/index>

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- А.А. Петкевич, И.Ж. Шубина, А.А. Абрамов, Л.Т. Мамедова,  
И.В. Самойленко, М.В. Киселевский*  
**Особенности экспрессии микроРНК в меланоцитах и клетках меланомы человека . . . . . 6**
- А.В. Шестаков, Т.В. Саприна, И.А. Ануфрак, О.Э. Гончикова, А.Л. Чернышева*  
**Метформин: новые перспективы в химиопрофилактике и терапии рака . . . . . 12**
- Е.В. Блынская, С.В. Тишков, К.В. Алексеев, С.В. Минаев*  
**Математические модели процесса сублимации и оптимизация режимов лиофилизации . . . . . 20**

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А.А. Вартамян, О.С. Бурова, Ю.А. Хоченкова, М.А. Барышникова*  
**Диалог между аутофагией и железом при прогрессии меланомы . . . . . 29**
- Ю.П. Финашутина, Н.А. Лыжко, Н.Н. Касаткина, Л.А. Кесаева,  
В.В. Тихонова, В.А. Мисюрин, М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин*  
**Иммунизация рекомбинантным белком PRAME замедляет рост  
PRAME-экспрессирующей опухоли у мышей . . . . . 36**
- И.Ж. Шубина, Е.М. Трещалина, С.А. Кузнецов, Г.Б. Смирнова, Ю.А. Борисова,  
С.М. Ситдикова, М.В. Киселевский, З.С. Шпрах*  
**Экспрессия эпителиального маркера цитokerатина СК19 у мышей  
с аденокарциномой молочной железы под действием  
фитоантиэстрогена секоизолярицирезинола . . . . . 43**
- К.С. Титов, Д.Л. Ротин, А.М. Казаков, О.Ю. Михеева, И.М. Тележникова, Д.А. Рябчиков*  
**Частота экспрессии тирозинкиназы гена *ALK* и онкобелка TAG-72  
при первичной меланоме кожи . . . . . 50**
- Н.Б. Морозова, Е.А. Плотникова, А.Д. Плютинская, В.О. Страмова, М.С. Воронцова,  
А.А. Панкратов, Р.И. Якубовская, Е.А. Макарова, Е.А. Лукьянец, А.Д. Каприн*  
**Доклиническое изучение препарата «Бактериосенс», предназначенного  
для фотодинамической терапии злокачественных новообразований,  
в том числе рака предстательной железы . . . . . 55**
- В.М. Бухман, Н.П. Ермакова, О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, А.А. Сергеев, В.А. Чалей*  
**Эквитоксичность Цисплатина-РОНЦ® и Цисплатина-Тева  
при однократном введении мышам и крысам . . . . . 65**
- Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова, О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская,  
Т.В. Абрамова, В.А. Чалей, А.А. Николина, В.М. Бухман*  
**Влияние препарата ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему . . . . . 70**
- М.И. Трещалин, И.Д. Трещалин, В.А. Голибродо, А.Е. Щекотихин, Э.Р. Переверзева*  
**Экспериментальная оценка токсических свойств ЛХТА-2034 при пероральном применении. . . . . 81**

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- О. И. Тарасова, А.А. Рыжова, И.Ю. Кубасова, Н.В. Голубцова, Л.Ю. Гривцова*  
**Защита объектов интеллектуальной собственности  
в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2017 году. . . . . 89**

## REVIEWS

- A.A. Petkevich, I.Zh. Shubina, A.A. Abramov, L.T. Mamedova,  
I.V. Samoilenko, M.V. Kiselevsky*  
**MicroRNA expression in melanocytes and melanoma cells** ..... 6
- A.V. Shestakov, T.V. Saprina, I.A. Anufrak, O.E. Gonchikova, A.L. Chernysheva*  
**Metformin: new perspectives in chemoprevention and therapy of cancer** ..... 12
- E.V. Blynskaya, S.V. Tishkov, K.V. Alekseyev, S.V. Minaev*  
**Mathematical models of the process of sublimation and optimization of lyophilization modes** ..... 20

## ORIGINAL REPORTS

- A.A. Vartanian, O.S. Burova, Yu.A. Khochenkova, M.A. Baryshnikova*  
**Crosstalk between autophagy and iron in melanoma progression** ..... 29
- Yu.P. Finashutina, N.A. Lyzhko, N.N. Kasatkina, L.A. Kesaeva, V.V. Tikhonova,  
V.A. Misyurin, M.A. Baryshnikova, A.V. Misyurin*  
**Recombinant human PRAME immunization reduces PRAME-expressing tumor growth in mice** ..... 36
- I.Zh. Shubina, E.M. Treshalina, S.A. Kuznetsov, G.B. Smirnova,  
Yu.A. Borisova, S.M. Sitdikova, M.V. Kiselevsky, Z.S. Shprakh*  
**Expression of epithelial marker CK19 in mice with mammary adenocarcinoma  
after exposure to fito-anti-estrogen secoisolariciresinol** ..... 43
- K.S. Titov, D.L. Rotin, A.M. Kazakov, O.U. Micheeva, I.M. Telezhnikova, D.A. Ryabchikov*  
**Expression rate of ALK tyrosine kinase and TAG-72 oncoprotein in primary skin melanoma** ..... 50
- N.B. Morozova, E.A. Plotnikova, A.D. Plyutinskaya, V.O. Stramova, M.S. Vorontsova,  
A.A. Pankratov, R.I. Yakubovskaya, E.A. Makarova, E.A. Lukyanets, A.D. Kaprin*  
**Preclinical trial of Bacteriosens used for the photodynamic therapy  
of malignant tumors, including prostate cancer** ..... 55
- V.M. Bukhman, N.P. Ermakova, O.I. Konyaeva,  
N.Yu. Kulbachevskaya, A.A. Sergeev, V.A. Chaley*  
**Equitoxicity Cisplatin-RONC® and Cisplatin-Teva at a single injection to mice and rats** ..... 65
- N.P. Ermakova, I.B. Merkulova, O.I. Konyaeva, N.Yu. Kulbachevskaya,  
T.V. Abramova, V.A. Chaley, A.A. Nikolina, V.M. Buchman*  
**The influence of the drug LHS-1208 on cardiovascular system** ..... 70
- M.I. Treschalin, I.D. Treschalin, V.A. Golibrodo, A.E. Shchekotikhin, E.R. Pereverzeva*  
**Experimental evaluation of toxic properties of LCTA-2034 by the oral route of administration** ..... 81

## BRIEF REPORT

- O.I. Tarasova, A.A. Ryzhova, I.Yu. Kubasova, N.V. Golubtsova, L.Yu. Gritsova*  
**Protection of intellectual property in N.N. Blokhin National Medical Research Center  
of Oncology in 2017** ..... 89

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ микроРНК В МЕЛАНОЦИТАХ И КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

А.А. Петкевич<sup>1</sup>, И.Ж. Шубина<sup>1</sup>, А.А. Абрамов<sup>2</sup>, Л.Т. Мамедова<sup>1</sup>, И.В. Самойленко<sup>1</sup>, М.В. Киселевский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям им. В.Ф. Войно-Ясенецкого ДЗМ»; Россия, 119620 Москва, ул. Авиаторов, 38

**Контакты:** Алиса Антоновна Петкевич [gluksworld@gmail.com](mailto:gluksworld@gmail.com)

Поиск маркеров ранней, по возможности доклинической диагностики онкологических заболеваний остается актуальным вопросом современной медицины. Одними из кандидатных молекул на роль подобных маркеров являются микроРНК. МикроРНК представляют собой короткие некодирующие нуклеотидные последовательности, играющие роль эпигенетического регулятора экспрессии генов. В статье освещаются основные особенности биологии и функционирования микроРНК. Особое внимание уделено роли микроРНК в нормальных меланоцитах и в биологическом материале при меланоме.

**Ключевые слова:** микроРНК, меланома, меланоциты, диагностический маркер

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-6-11

### MicroRNA EXPRESSION IN MELANOCYTES AND MELANOMA CELLS

A.A. Petkevich<sup>1</sup>, I.Zh. Shubina<sup>1</sup>, A.A. Abramov<sup>2</sup>, L.T. Mamedova<sup>1</sup>, I.V. Samoilenko<sup>1</sup>, M.V. Kiselevsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>SBIH "NPC specialized medical help for children, Moscow Healthcare Department"; 39 Aviatorov St., Moscow 119620, Russia

Diagnostic biomarkers cancer diagnostics at preclinical stage seem to be a very promising strategy to increase effectiveness of anti-cancer treatment. Currently there are no such biomarkers available for daily routine practice. However, there are some candidate molecules in research that possibly can be used as biomarkers for early diagnosis, one of them is microRNA. MicroRNA is a small, 20–25 bp, non-coding RNA that is highly involved into epigenetic regulation of gene expression. These molecules participate in malignant transformation of normal cells into cancer cells including melanoma. And moreover, definite expression level of some microRNAs are essential for normal differentiation and function of human cells. Changes in microRNA profile are one of the reasons for malignant tumor development. Identification of these changes may help to develop diagnostic systems to start anti-cancer treatment at early stages.

**Key words:** microRNA, melanocytes, melanoma, diagnostic markers

#### Введение

МикроРНК (miRNA, miR, microRNA) представляют собой малые некодирующие последовательности (в среднем 18–25 нуклеотидов), которые являются одним из механизмов эпигенетической регуляции, в частности на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Они известны с 1993 г., когда впервые были обнаружены при исследовании мутантных линий нематод *C. elegans* [1]. Последовательности, кодирующие микроРНК, по разным данным, занимают от 1 до 3 % генома млекопитающих, при этом большая часть находится в интронных областях генов [2]. Эти молекулы регулируют экспрессию как минимум половины транскриптома человека путем ингибирования трансляции или запуская процессы деградации микроРНК [3]. В 2005 г. группа ученых во главе с J. Lu [4] выдвинула смелое предположение,

что исследование профиля микроРНК может позволить получить больше информации о состоянии опухолевых клеток, чем выделение значительных участков микроРНК.

По данным базы mirBase [5], сегодня известны более 2000 различных микроРНК, функциональное назначение большинства из которых остается неясным. Было совершено множество попыток найти практическое применение микроРНК: как молекулярный параметр для определения последствий инсульта и последующей тактики ведения больного [6], в качестве терапевтических препаратов [7], в качестве прогностических маркеров или маркеров для ранней доклинической диагностики в онкологии [8, 9]. Однако на данный момент ни один из предложенных вариантов диагностики не дошел до рутинной клинической практики.

Особенно много исследований посвящено возможности применения микроРНК при постановке диагноза или определении тактики лечения меланомы. Меланома является относительно редким типом рака кожи (около 1 %), наряду с этим обладая самыми высокими показателями летальности – до 75 % всех смертельных случаев из-за рака кожи [10]. Показатели заболеваемости меланомой возрастают в течение последних 40 лет, и предполагается, что будут увеличиваться как минимум до 2022 г. [11].

### Биология микроРНК

МикроРНК в основном кодируются на интронном или интергенном участках дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [12]. Они транскрибируются в более крупные при-микроРНК (pri-miRNA) ферментом РНК полимеразой II, затем с помощью РНК полимеразы III совместно с ферментами Droscha и *DGCR8* (DiGeorge syndrome critical region 8) – во внутриядерные предшественники микроРНК пре-микроРНК (pre-miRNA), имеющие форму шпильки и состоящие из 70 нуклеотидов. Далее происходит транспорт пре-микроРНК в цитоплазму экспортином-5, где эта молекула превращается в зрелые двойные структуры микроРНК (duplexesRNA, dsRNA) посредством действия ферментного комплекса, включающего белки Дайсер, AGO (argonaute 2) и RBP (transactivation-responsive RNA-binding protein). Механизм действия полученной структуры микроРНК следующий: одна цепочка дуплексной рибонуклеиновой кислоты (РНК) взаимодействует с RISC (RNA-inducing silencing complex), где микроРНК играет роль негативного регулятора трансляции мРНК (матричной РНК). Это осуществляется путем взаимодействия 3'UTR участка или кодирующей последовательности таргетного транскрипта с 2–8 нуклеотидами последовательности зрелой микроРНК. Есть данные [13] о способности микроРНК связываться также и с 5'UTR областью мРНК, при этом может меняться и функция микроРНК: например, микроРНК-10 участвует в повышении уровня трансляции мРНК рибосомального белка, связываясь именно с 5'UTR участком гена. При этом варианты ключевых последовательностей, которые служат для связи микроРНК с мРНК, довольно консервативны, в связи с чем их также используют как критерий для деления микроРНК на различные категории. А. Helwak и др. в 2013 г. показали, что процесс взаимодействия микроРНК с мРНК не так прост и включает не только образование связей с 2–8 нуклеотидами [14]. Более того, минимум 35 % образующихся связей между микроРНК и мРНК происходит без участия 2–8 нуклеотидов, что, возможно, повышает специфичность воздействия микроРНК. Вторая нить дуплексной микроРНК деградирует, хотя уже с 2011 г. появляются данные о том,

что пассажирская цепочка микроРНК также несет ряд функций [15]. Интересен также и тот факт, что микроРНК могут действовать как внутри ядра (приведенный выше пример взаимодействия с RISC), так и в цитоплазме. При этом их роли могут быть различными и не зависеть от локации: микроРНК-9 играет роль супрессора для длинной некодирующей цепочки РНК *MALAT1*, также внутриядерные микроРНК могут связываться с пре-мРНК и ДНК, участвуя и в какой-то степени благоприятствуя процессам альтернативного сплайсинга [16].

### Особенности генетической регуляции меланоцитов

В настоящее время известно около 200 генов, задействованных только в созревании и функционировании меланоцитов. К ключевым относятся гены *MITF*, *SOX10* (SRY-box containing gene 10) и *PAX3*. Ген *MITF* (melanogenesis associated transcription factor) отвечает за экспрессию транскрипционного фактора, необходимого для продукции меланина и за экспрессию в меланоцитах фермента DICER, участвующего в формировании молекул микроРНК. К факторам, влияющим на активацию транскрипции данного гена, относят *PAX3* (paired box 3) и *SOX-10* (SRY-box containing gene-10) [17]. *PAX3* также влияет на поддержание стволовых клеток – предшественников меланоцитов [18]. *SOX-10* регулирует дифференциацию мигрирующих из нервного гребня клеток, в том числе меланоцитов, нейронов и клеток глии. Кроме того, данный ген задействован в экспрессии меланогенных ферментов наряду с тем, что может принимать участие в активации экспрессии гена *MITF* [19, 20]. В свою очередь, на каждый из этих генов тем или иным образом могут воздействовать, помимо иных факторов, молекулы микроРНК. Сегодня известно несколько микроРНК, участвующих в миграции, специализации и дифференцировке клеток – предшественников меланоцитов. К известным микроРНК с подобными функциями относятся: микроРНК-140 (участвует в клеточной дисперсии клеток нервного гребня); микроРНК-143 и микроРНК-145 (участвуют в переходе эмбриональной стволовой клетки из состояния плюрипотентности путем взаимодействия с генами *KLF4* (Kruppel-like factor 4), *SOX2* и *ОСТ4* (octamer binding transcription factor 4)). МикроРНК-145 является одной из значимых регуляторных молекул, ответственных за формирование ответа меланоцитов на внешние стимулы: при воздействии на клетки форсколином и ультрафиолетовым излучением исследователи группы Р. Dunoedt и др. (2013) [21] обнаружили изменение в уровне экспрессии 16 различных микроРНК. При этом повышение или понижение уровня экспрессии микроРНК-145 в клетках по сравнению с контролем вызывали повышение или снижение уровня экспрессии генов

*SOX9*, *MITF*, *TYR*, *TRP1*, *MYO5a*, *RAB27a* и *FSCN1*. Предполагается, что микроРНК-125b является регулятором устойчивого меланогенеза. Среди целевых молекул ее воздействия – ферменты Туг и DCT, являющиеся ключевыми в продукции меланина, при этом обнаружен обратный характер зависимости между концентрациями пигмента и микроРНК-125b [22]. Промоторный участок данной микроРНК метилирован в значительно пигментированных клетках. МикроРНК-145 играет одну из ведущих ролей в регуляции меланогенеза в ответ на внешние стимулы [23]. Также обнаружена зависимость выраженности пигментации от концентрации микроРНК-137, влияющей на уровень экспрессии гена *MITF*, нокаут которого, в свою очередь, оказывается летальным для меланоцитов [24, 25]. Высокий уровень экспрессии микроРНК-192 и микроРНК-194 отмечается в нормальных меланоцитах в сравнении с клетками других типов [26]. Наряду с этим высокий уровень экспрессии в нормальных меланоцитах в сравнении с другими эпителиальными клетками характерен для следующих микроРНК: *let-7* (*let-7a-i*), микроРНК-219a, микроРНК-320a и микроРНК-378, однако их функция на данный момент остается неясной [27].

#### **Возможности применения микроРНК в качестве диагностических, прогностических и предиктивных маркеров при онкологических заболеваниях**

В число обязательных качеств любого маркера наряду с другими входят неинвазивность, специфичность и чувствительность, однозначность и адекватная стоимость [28]. В 2007 г. С.Н. Lawrie и др. [29] одними из первых предложили использовать микроРНК как диагностический маркер при В-клеточной лимфоме. В многочисленных работах показана стабильность молекул микроРНК в парафиновых блоках при исследовании гепатоцеллюлярной карциномы [30], рака легкого и меланомы [31–33], рака поджелудочной железы [34], папиллярной карциномы щитовидной железы [35] и опухоли почек [36]. МикроРНК определяются также и в плазме, соскобе с щеки и слюне пациентов, причем ряд микроРНК определяется во всех обозначенных биологических материалах. Это может свидетельствовать о том, что циркулирующие в крови микроРНК происходят из опухолевой ткани и не подвергаются воздействию эндогенных рибонуклеаз [37]. Также плазменные микроРНК стабильны при воздействии определенных внешних факторов (высокое или низкое значение pH, кипячение, разморозка/заморозка, длительное хранение при комнатной температуре) [38]. В свою очередь, молекулы микроРНК могут как свободно находиться в плазме крови, так и быть в составе экзосом, микровезикул размерами 30–120 нм, участвующих в межклеточном взаимодействии.

В ряде исследований было доказано содержание микроРНК в экзосомах, а также их способность при такой форме доставки влиять на физиологию клеток – реципиентов экзосом [39].

#### **Особенности экспрессии микроРНК при меланоме**

По данным группы исследователей M.S. Stark и др. (2015), в меланомных линиях клеток ( $n = 55$ ) в сравнении с клеточными линиями солидных опухолей ( $n = 34$ ) изменяется уровень экспрессии 233 из 1898 исследованных микроРНК [40]. Таргетные гены микроРНК при меланоме функционально относятся прежде всего к группам, влияющим на уровень экспрессии, клеточный цикл, репликацию и пролиферацию ДНК. Показано, что при меланоме отмечается повышенный уровень экспрессии минимум 519 генов в клетках метастатических линий и клеточных культурах меланомы человека, среди которых экспрессия гена *ANPEP* значительно повышена (в ~5 раз), тогда как уровень экспрессии генов *CFL1* и *MTA2*, наоборот, снижен (первого – до ~0,8 раза) [41]. Оба последних указанных гена участвуют в регуляции морфологии клеток, что может обуславливать их способность к метастазированию [40]. Впервые влияние микроРНК на процесс канцерогенеза при меланоме было отмечено при изучении функции уже упомянутого белка Dicer, функционирование которого необходимо для выживания дифференцированных клеток, мигрировавших с нервного гребня [20]. В сети взаимодействующих генов, являющихся таргетными для микроРНК, уровень экспрессии которых изменен при меланоме, N. Ding и др. [42] выделяет несколько ключевых, которые взаимодействуют с еще 5 аналогичными генами: *AGO2*, *AKT1*, *APP*, *STAT1*, *KRAS*, *AHR*, *BAK1* и *PARP1*. При этом гены *AKT1*, *KRAS* и *PARP1* регулируются рядом молекул микроРНК, включающим микроРНК-148a-3p, -129-5p, -34a-5p, -363-3p и -374b-5p.

Уровень экспрессии основных представителей семейства микроРНК-34 (-34a, -34b, -34c) при меланоме изменяется по сравнению с группой контроля. В свою очередь, экспрессия этих микроРНК регулируется геном *p53*. Известно, что микроРНК-34a, самая изученная среди всех представителей семейства, участвует в апоптозе, индуцированном *p53*. Данная микроРНК напрямую ингибирует антиапоптотический белок сиртулин 1 (SIRT1). Другой механизм действия микроРНК-34c, способствующий ингибированию роста опухоли, заключается в воздействии через мРНК на экспрессию ряда генов, в числе которых циклинзависимая киназа 4 (cyclin-dependent kinase, CDK4) и CDK6, антиапоптотические белки, такие как BCL2, и белки, ассоциированные с метастазами (MET, Notch, MYC и AXL) [43]. В последнее время появляются данные о корреляции между

экспрессией микроРНК-34а и рецепторами PDL1 (programmed cell death ligand 1). Высокий уровень экспрессии последнего на мембранах иммунокомпетентных клеток онкологических больных в сравнении со здоровыми пациентами имеет негативное прогностическое значение. Характер зависимости экспрессии обратный: при высоких значениях экспрессии микроРНК-34а наблюдается низкое значение экспрессии рецептора PDL1 и наоборот [44]. Уровень экспрессии микроРНК-10b изменяется при меланоме, а также при раке молочной железы и глиобластоме. Изменение уровня экспрессии данной микроРНК может быть обусловлено взаимодействием с ее промотором транскрипционного фактора TWIST 1 (twist related protein 1), в свою очередь, задействованного в формировании фенотипа клеток, свойственного эпителиально-мезенхимальному переходу. МикроРНК-10b также подавляет экспрессию *HOXD10*, что способствует развитию метастатической активности клеток [45]. При меланоме изменяется экспрессия микроРНК-15-16, таргетными генами которой являются *BCL2* (B-cell lymphoma 2), *CDK1*, *ETS1* (26 transformation-specific or E-twenty-six) и *JUN*, которые вовлечены в процесс опухолевого прогрессирования [46]. На мышинной модели было продемонстрировано, что удаление локуса 13q14.3, который содержит кластер опухолевых супрессоров микроРНК-15-16, приводит к развитию автономных лимфопролиферативных заболеваний. У человека течение хронической лимфоцитарной лейкемии часто сопровождается частичной делецией данного локуса [47]. Одновременно при меланоме наблюдается снижение уровня экспрессии микроРНК-125b по сравнению со здоровыми пациентами, при этом никакой ассоциации между уровнем экспрессии данной микроРНК и содержанием пигмента в опухолевых клетках не обнаруживается [23].

#### **МикроРНК – основа нового класса терапевтических препаратов**

В 2013 г. компания Mirna Therapeutics начала I фазу клинических испытаний препарата MRX34, представляющего собой аналог микроРНК-34, инкапсулированный в липидные частицы NOV40. Эти частицы способны адгезироваться на поверхности опухолевых клеток за счет способности приобретать положительный заряд поверхности при попадании в среду с низким значением pH, что свойственно опухолевому микроокружению. В экспериментах на мышах были показаны значительное аккумулярование молекул микроРНК-34 в опухолевой ткани и значительный регресс опухолевого процесса. Первая фаза многоцентрового клинического испытания была начата с участием пациентов с первичным раком печени, мелкоклеточным раком легкого, лимфомой,

меланомой, множественной миеломой и раком почки [48]. Исследование включало изучение повышенной дозы препарата по определенной схеме, MRX34 вводился в форме внутривенных инъекций. К июню 2016 г. около 99 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, немелкоклеточным раком легкого и раком предстательной железы также были включены в исследование. К концу испытания 3 пациента, в том числе пациент с акральной меланомой, достигли продолжительного терапевтического ответа, у 14 пациентов наблюдалась стабилизация онкологического процесса (средняя продолжительность 136 дней, диапазон значений 79–386 дней). Первая стадия клинических испытаний была прекращена по причине смерти пациентов от возникших побочных иммунных реакций [49]. Многообещающие результаты на мышинной модели были показаны при воздействии на метастатическую меланому молекулами микроРНК-26а и микроРНК-let-7а, при этом микроРНК-26а значительно замедлила рост опухолевых клеток *in vivo*, отчасти посредством воздействия на уровень экспрессии *MITF* [50]. Также перспективными в качестве терапевтических молекул являются микроРНК-200с и микроРНК-579-3р, которые обладают функциями онкосупрессоров и могут усиливать действие препаратов, ингибирующих MAPK-сигнальный путь, а также противодействуют развитию лекарственной резистентности клеток меланомы [51].

#### **Заключение**

МикроРНК, являясь структурами с высокой функциональной и информационной нагрузкой, отражают некоторые генетические изменения в клетках организма. Таким образом, они теоретически могут выполнять роль биомаркеров злокачественных заболеваний, в том числе меланомы, еще на доклиническом этапе [50]. К одним из наиболее перспективных в качестве диагностических маркеров микроРНК при меланоме, определяемым в сыворотке крови, можно отнести микроРНК-211-5р, -204-5р, -145-5р, -146а-5р, -34а-5р, -514а-3р и -129а-5р. Разумеется, в данном случае речь может идти только об использовании панели нескольких микроРНК и изменении их соотношения в сравнении с данными, полученными в контрольной группе. В качестве диагностических маркеров у микроРНК есть определенные преимущества – молекула ввиду своего строения довольно стабильна, что позволяет выделять ее из всех биологических жидкостей, в том числе после заморозки (соскоб со щеки, слюна, плазма, кровь, моча и т. д.), причем молекулы микроРНК могут содержаться в двух формах – в качестве свободных микроРНК и в составе экзосом. Для обоих случаев существуют стандартные протоколы исследований. Однако ввиду проблем специфичности и некоторых трудно-

стей аналитического этапа (вопрос нормализации полученных данных полимеразной цепной реакции) стремление к использованию микроРНК в качестве инструмента первичной диагностики в по-

следнее время снизилось, но одновременно с этим для микроРНК открываются другие, более реальные перспективы — мониторинг проводимой терапии и использование в качестве терапевтических молекул.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Lee R., Feinbaum R., Ambros V. et al. A short history of a short RNA. *Cell* 2004;116:89–92. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00035-2.
- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2006;128(2):281–97.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431(7006):350–5. DOI: 10.1038/nature02871.
- Lu J., Getz G., Miska E.A. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834–8. DOI: 10.1038/nature03702.
- miRBase: the microRNA database [Сайт]. URL: <http://www.mirbase.org/>
- Hunsberger J.G., Fessler EB., Wang Z. et al. Post-insult valproic acid-regulated microRNAs: potential targets for cerebral ischemia. *Am J Transplant Res* 2012;4(3):316–22. PMID: 22937209.
- Ajay F.C., Raman P.K., Gunpreet K. et al. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res* 2016;7(2):68–74. DOI: 10.4103/2229–3485.179431.
- Wang J., Chen J., Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol* 2016;231(1):25–30. DOI: 10.1002/jcp. 25056.
- Witwer K.W. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clin Chem* 2015;61(1):56–63. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221341.
- Berezikov E., Chung W.J., Willis J. Mammalian Mirtron Genes. *Mol Cell* 2007;28(2):328–36. DOI: 10.1016/j. molcel. 2007.09.028.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta: American Cancer Society, 2016. Pp. 1–9.
- Gu W., Xu Y., Xie X. et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites *RNA* 2014;20(9):1369–75. DOI: 10.1101/gr.089367.108.
- Helwak A., Kudla G., Dudnakova T. et al. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 2013;153(3):654–65. DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.043.
- Федянин М.Ю., Игнатова Е.О., Тюляндин С.А. Роль микро-РНК при солидных опухолях. Злокачественные опухоли 2013;1:3–14. DOI: 10.18027/2224-5057-2013-1-3-14. [Fedianin M.Yu., Ignatova E.O., Tyulyandin S.A. Micro-RNA in solid tumors. *Zlokachestvennie Opukholi = Malignant tumors* 2013;1:3–14 (In Russ.)].
- Boutz P.L., Chawla G., Stoilov P. et al. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev* 2007;21:71–84. DOI: 10.1101/gad.1500707.
- Whiteman D.C., Green A.C., Olsen A. et al. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J Invest Dermatol* 2016;136(6):1161–71. DOI: 10.1016/j.jid.2016.01.035.
- Golianek-Whysall K., Sweetman D., Abu-Elmagd M. et al. MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(29):11936–41. DOI: 10.1073/pnas.1105362108.
- Elworthy S., Lister J.A., Carney T.J. et al. Transcriptional regulation of mitfa accounts for the sox10 requirement in zebrafish melanophore development. *Development* 2003;130(12):2809–18. PMID: 12736222.
- Nie X., Wang Q., Jiao K. et al. Dicer activity in neural crest cells is essential for craniofacial organogenesis and pharyngeal arch artery morphogenesis. *Mech Dev* 2011;128(3–4):200–7. DOI: 10.1016/j.mod.2010.12.002.
- Dynoodt P., Mestdagh P., van Peer G. et al. Identification of miR-145 as a key regulator of the pigmentary process. *J Invest Dermatol* 2013;133(1):201–9. DOI: 10.1038/jid.2012.266.
- Wandler A., Riber-Hansen R., Hager H. et al. Quantification of microRNA-21 and microRNA-125b in melanoma tissue. *Melanoma Res* 2017;27(5):417–28. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000374.
- Kim K.H., Bin B.H., Kim J. et al. Novel inhibitory function of miR-125b in melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014;27:140–4. DOI: 10.1111/pcmr.12179.
- Li Y., Huang Q., Shi X. et al. MicroRNA 145 may play an important role in uveal melanoma cell growth by potentially targeting insulin receptor substrate-1. *Clin Med J* 2014;127(8):1410–6. DOI: 10.3760/cma.j.issn. 0366–6999.20133206.
- Levy C., Khaled M., Robinson K.C. et al. Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes. *Cell* 2012;141:994–1005. DOI: 10.1016/j.Cell. 2010.05.004.
- Caramuta S., Eghazi S., Rodolfo M. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2010;130(8):2062–70. DOI: 10.1038/jid.2010.63.
- Banerjee J., Chan Y.C., Chandan K. et al. MicroRNAs in skin and wound healing. *Physiol Genomics* 2011;43(10):543–56. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00157.2010.
- Lawrie C.H. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. *Br J Haematol*. 2007;137(6):503–12. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06611.x.
- Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx* 2004;1(2): 182–8. DOI: 10.1602/neurorx.1.2.182.
- Toffanin S., Hoshida Y., Lachenmayer A. et al. MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a. *Gastroenterology*. 2011;140(5):1618–28. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.02.009.
- Barshack I., Lithwick-Yanai G., Afek A. et al. MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung. *Pathol Res Pract*. 2010;206(8):578–84. DOI: 10.1016/j.prrp.2010.03.005.
- Власов В.В., Рыкова Е.Ю., Пономарева А.А. и др. Циркулирующие микроРНК крови при раке легкого: пер-

- спективы использования для диагностики, прогноза и оценки эффективности терапии. Молекулярная биология 2015;49 (1):55–66. DOI: 10.7868/S0026898415010164. [Vlasov V.V., Rykova E.U., Ponomareva A.A. et al. Circulating blood micro-RNA in lung cancer: perspectives for the diagnostic and prognostic usage and treatment effectiveness assessment. Molekulyarnaya biologiya = Molecular biology 2015;49(1):55–66 (In Russ.)].
32. Швецова Ю.И., Палкина Н.В., Аксененко М.Б. и др. Анализ экспрессии микро-РНК при меланоме кожи. Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2014;3:43–6. [Shvetsova U.I., Palkina N.V., Akseenko M.B. et al. Analysis of micro-RNA expression in skin melanoma. Onklogiya. Zhurnal im. P.A. Gertsena = Oncology. Journal of P.A. Hertsen. 2014;3:43–6 (In Russ.)].
33. Ali H., Saleh S., Sethi S. et al. MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer. Br J Cancer 2012;107(8):1354–60. DOI: 10.1038/bjc.2012.383.
34. Tetzlaff M.T., Liu A., Xu X. et al. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. Endocrine Pathol 2007;18(3):163–73. DOI: 10.1007/s12022 007 0023 7.
35. Fridman E., Dotan Z., Barshack I. et al. Accurate molecular classification of renal tumors using microRNA expression. J Mol Diagn 2010;12 (5):687–96. DOI: 10.2353/jmoldx.2010.090187.
36. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105 (30):10513–8. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
37. Lin S., Gregory R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nat Rev Cancer 2015;15(6):321–33. DOI: 10.1038/nrc3932.
38. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(30):10513–8.
39. Ding N., Wang S., Qiong Y. et al. Deep sequencing analysis of microRNA expression in human melanocyte and melanoma cell lines. Gene 2015;572(1):135–45. DOI: 10.1016/j.gene.2015.07.013.
40. Stark M.S., Bonazzi V.F., Boyle G.M. et al. MiR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAF sensitivity in melanoma. Oncotarget 2015; Advance Online Publications: P. 3.
41. Brandhagen A.N., Chelsea R.T., Tara M.U. et al. Cytostasis and morphological changes induced by mifepristone in human metastatic cancer cells involve cytoskeletal filamentous actin reorganization and impairment of cell adhesion dynamics. BMC Cancer 2013;13:35–9. DOI: 10.1186/1471-2407-13-35.
42. Misso G., Di Martino M.T., De Rosa G. et al. Mir-34: a new weapon against cancer? Mol Ther Nucleic Acids. 2014;3:e194. DOI: 10.1038/mtna.2014.47.
43. Cortez M.A., Ivan C., Valdecanas D. et al. PDL1 regulation by p53 via miR-34. J Natl Cancer Inst. 2015;108(1):182–6. DOI: 10.1093/jnci/djv303.
44. Bloomston M., Frankel W.L., Petrocca F. et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. JAMA 2007;297(17):1901–8. DOI: 10.1001/jama.297.17.1901.
45. Mattia G., Errico M.C., Felicetti F. Constitutive activation of the ETS-1-miR-222 circuitry in metastatic melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2011;24(5):953–65. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2011.00881.x.
46. Cutrona G., Matis S., Ferrarini M. Effects of miRNA-15 and miRNA-16 expression replacement in chronic lymphocytic leukemia: implication for therapy. Leukemia 2017;31:1894–904. DOI: 10.1038/leu.2016.394.
47. Beg M.S., Brenner A.J., Sachdev J. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs 2017;35(2):180–8. DOI: 10.1007/s10637 016 0407-y.
48. A Multicenter Phase I Study of MRX34, MicroRNA miR-RX34 Liposomal Injection. U. S. National Library of Medicine [Сайт]. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01829971>.
49. Киселева Я.Ю., Радько С.П., Бодоев Н.В. Циркулирующие микроРНК как диагностические маркеры онкологических заболеваний. Вестник Российской академии естественных наук 2015;5:79–85. [Kiseleva Ya.Yu., Radko S.P., Bodoev N.V. Circulating micro-RNA as a diagnostic markers of the cancer. Vestnik Rossiyskoy akademii estestvennyh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences 2015;5:79–85 (In Russ.)].
50. Qian H., Yang C., Yang Y. MicroRNA-26a inhibits the growth and invasiveness of malignant melanoma and directly targets on MITF gene. Cell Death Discov 2017;3:17028–35. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.28.
51. Fattore L., Costantini S. MicroRNAs in melanoma development and resistance to target therapy. Oncotarget 2017;8(13):22262–78. DOI: 10.18632.

**ORCID авторов / ORCID of authors**И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <http://orcid.org/0000-0002-9374-3158>И.В. Самойленко / I.V. Samoilenko: <http://orcid.org/0000-0001-7150-5071>М.В. Киселевский / M.V. Kiselevsky: <http://orcid.org/0000-0002-0132-167X>**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

## МЕТФОРМИН: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ В ХИМИОПРОФИЛАКТИКЕ И ТЕРАПИИ РАКА

А.В. Шестаков<sup>1</sup>, Т.В. Саприна<sup>1</sup>, И.А. Ануфрак<sup>1</sup>, О.Э. Гончикова<sup>1</sup>, А.Л. Чернышева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;  
Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»,  
НИИ онкологии; Россия, 634028 Томск, ул. Савиных, 12/1

**Контакты:** Татьяна Владимировна Саприна [tvsaprina@gmail.com](mailto:tvsaprina@gmail.com)

Согласно современным данным метформин (МФ) является уникальным лекарственным средством, в котором сочетаются сахароснижающий и антипролиферативный эффекты. В последние десятилетия появляются все больше новых исследований на тему механизмов действия МФ и его эффективности у онкологических больных. Многие исследователи говорят о МФ как о потенциальном препарате для химиопрофилактики и адъювантной терапии разных типов рака. В данном обзоре рассмотрены актуальные исследования данного препарата в контексте его возможных антинеопластических эффектов.

**Ключевые слова:** метформин, метилирование, АМПК, сахарный диабет

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-12-19

### METFORMIN: NEW PERSPECTIVES IN CHEMOPREVENTION AND THERAPY OF CANCER

A. V. Shestakov<sup>1</sup>, T. V. Saprina<sup>1</sup>, I. A. Anufrak<sup>1</sup>, O. E. Gonchikova<sup>1</sup>, A. L. Chernysheva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia;

<sup>2</sup>Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Medical Sciences, Oncology Research Institute;  
12/1 Savinykh St., Tomsk, 634028, Russia

According to modern data, metformin is a unique drug, which can act not only as sugar-reducing medicine, but also as an antiproliferative element. More and more new researches about metformin effects in oncologic patients appear during last decades. A lot of researchers suppose that metformin is a new promising medicine for chemopreventive and neoadjuvant cancer therapy. This literature review covers current researches of metformin in context of its possible antiproliferative effects.

**Key words:** metformin, methylation, AMPK, diabetes mellitus

#### Введение

Сахароснижающий бигуанид метформин (МФ) является наиболее часто назначаемым лекарственным средством при сахарном диабете 2-го типа (СД2). Современные представления о данном препарате расширяются его влиянием на процессы метилирования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), снижением риска канцерогенеза, улучшением прогноза у пациентов с разными формами рака [1]. Многие исследования показывают, что МФ обладает потенциалом использования в качестве нового препарата для химиопрофилактики и адъювантной терапии рака, особенно у пациентов с СД2 [1–3].

Механизмы действия МФ разнонаправленны и не до конца изучены. Однако ведущей концепцией является его воздействие на активность аденозинмонофосфаткиназы (АМПК) с последующим изменением выраженности каскада реакций мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) [4]. Кроме того, в последние годы было обнаружено влияние МФ на

реализацию эпигенетического контроля наследственной информации, в частности на процессы метилирования ДНК [3, 4]. Это открывает новые перспективы в изучении молекулы МФ в качестве препарата противоопухолевой терапии.

#### Молекулярные механизмы действия метформина на канцерогенез

Выделяют 2 основных молекулярных механизма действия МФ на опухолевые клетки: прямой и опосредованный.

Опосредованный механизм действия МФ осуществляется в первую очередь за счет формирования нормогликемии и повышения чувствительности тканей к инсулину. Данные эффекты препарата снижают риск возникновения СД2 и ассоциированного с ним ожирения, которые, в свою очередь, являются факторами риска развития разных вариантов неоплазий [4]. В комплексном обзоре 27 тематических метаанализов было показано наличие достоверной

взаимосвязи СД2 с разными формами рака, в большей степени с раком молочной железы (РМЖ), раком эндометрия (РЭ), внутривеночной холангиокарциномой и колоректальным раком [5]. Кроме того, в эксперименте *in vitro* было показано, что пониженное количество поступающей в клетку глюкозы при определенных условиях вызывает эффект пониженного количества в ней ростовых факторов, снижая тем самым процессы пролиферации [3]. До сих пор нет ответа на вопрос, осуществляется ли подобный механизм непрямого воздействия на опухолевые клетки у людей без диабета, так как данный эффект продемонстрирован *in vitro* и только у пациентов с СД2.

Реализация опосредованного пути также может происходить за счет снижения МФ уровней инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF) в крови. Раковые клетки обладают повышенной экспрессией рецепторов IGF, в связи с чем ранее выдвигалась гипотеза о возможном антипролиферативном эффекте их блокаторов. Этот механизм не был подтвержден клиническими испытаниями из-за предполагаемых перекрестных взаимодействий с рецепторами IGF

и инсулина [6]. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* МФ снижал опухолевый рост при раке предстательной железы за счет отрицательного воздействия на реализацию IGF-опосредованной сигнальной системы [7]. Влияние на IGF-1 также прослеживается и у группы тиазолидиндионов. Данный эффект, вероятно, не связан с влиянием на PPAR $\gamma$ . Действие тиазолидиндионов обусловлено снижением экспрессии IGF-1 и отрицательным влиянием на гиперинсулинемию, а также ингибированием IGF-1-опосредованных сигналов [8].

Прямой механизм действия на опухолевые клетки осуществляется главным образом через влияние МФ на AMPK [4]. Доказано, что во многих типах опухолевых клеток имеется высокая степень активности mTOR [9]. Активированная AMPK фосфорилирует молекулы TSC2 и Raptor, что в конечном счете приводит к снижению активности C1-фрагмента молекулы mTOR (mTORC1). Так, происходит снижение промитотической активности, а также активация апоптоза опухолевых клеток (см. рисунок) [3, 10].

Одним из AMPK-зависимых антипролиферативных механизмов МФ является ингибирование синтеза

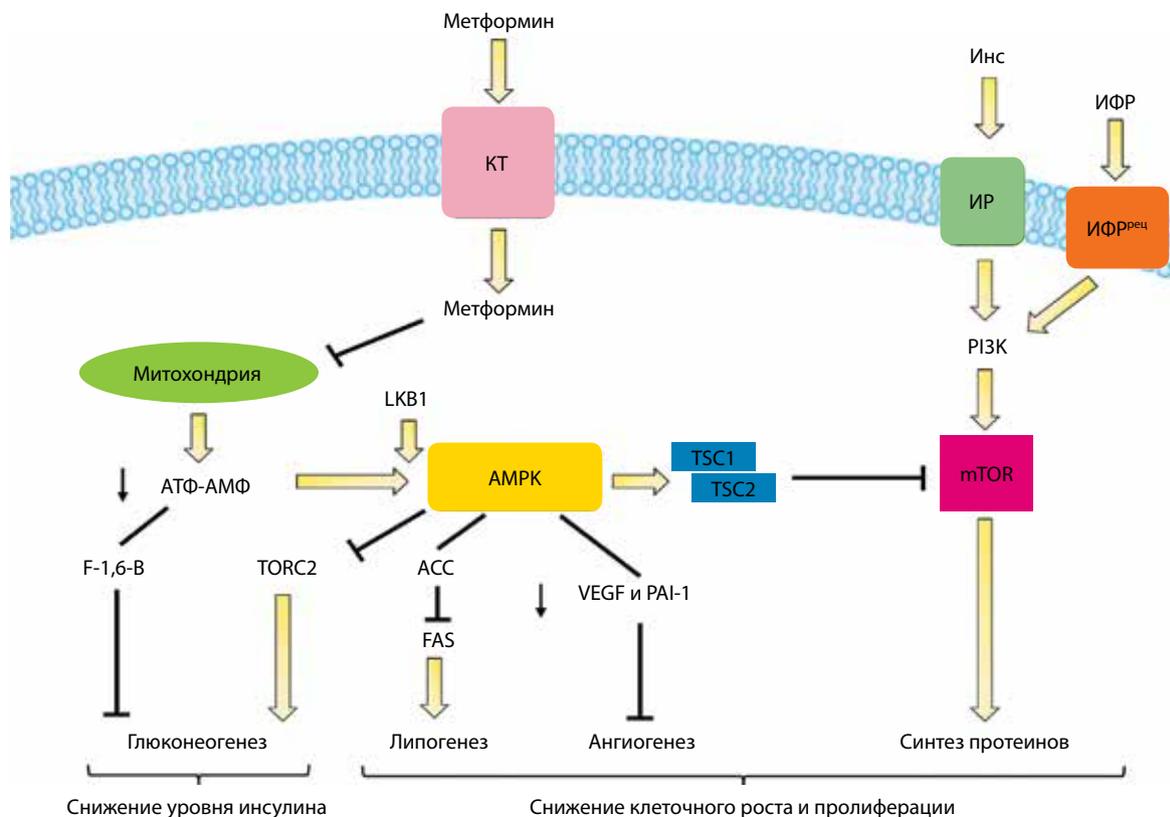


Схема действия метформина на аденозинмонофосфаткиназу (адаптировано из [3]). После проникновения в клетку через катионный транспортер (КТ) метформин вызывает снижение количества аденозинмонофосфаткиназы через ингибирование митохондриального дыхательного комплекса 1, что приводит к активации аденозинмонофосфаткиназы. Активированная аденозинмонофосфаткиназа вызывает снижение экспрессии генов, принимающих участие в глюконеогенезе, липогенезе, синтезе протеинов и ангиогенезе. ACC – ацетил-КоА-карбоксилаза; F-1,6-B – фруктозо-1,6-бисфосфатаза; FAS – синтетаза жирных кислот; Инс – инсулин; ИР – инсулиновый рецептор; ИФР – инсулиноподобный фактор роста; ИФР<sup>rec</sup> – рецептор ИФР; LKB1 – серин-треонин печеночная киназа B1; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; PAI-1 – ингибитор-1 активатора плазминогена; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; TORC2 – кофактор транскрипции CREB-связанного белка 2; TSC1 – комплекс туберозного склероза 1; TSC2 – комплекс туберозного склероза 2; VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста.

жирных кислот. Синтаза жирных кислот (FAS) является ключевым ферментом биосинтеза последних, при этом во многих типах опухолей обнаружено повышение активности FAS, в большей степени при РМЖ и колоректальном раке. [11]. Метформин *in vitro* показал снижение экспрессии FAS с последующим снижением роста рака предстательной железы [3].

В процессе развития многих неоплазий важную роль играет хроническое воспаление, в частности через путь ядерного фактора  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ). Установлено, что активация NF- $\kappa\text{B}$  приводит к увеличению степени пролиферации и инвазии раковых клеток [12]. МФ уменьшает экспрессию NF- $\kappa\text{B}$  опосредованно через AMPK-зависимое снижение активности фактора некроза опухоли альфа, а также фосфорилирования MAP-киназ (p38, JNK и Erk) и протеинкиназы B [3].

Важно отметить, что при ожирении у пациентов наблюдается повышение уровней следующих провоспалительных цитокинов, ассоциированных с канцерогенезом: лептина, адипонектина, интерлейкинов 1- $\beta$  и 6, ингибитора активации плазминогена 1 и фактора некроза опухоли альфа [13, 14]. При активации AMPK происходит снижение выделения провоспалительных цитокинов из макрофагов и адипоцитов, что означает возможное влияние МФ на выраженность хронического воспаления в микроокружении опухолевых клеток [15].

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) предполагает приобретение эпителиальноклеточными формами рака высокой инвазивности и высокого риска метастазирования, характерных для мезенхимальных клеток. Метформин способен влиять на данный процесс через AMPK-опосредованный механизм при РМЖ, яичников, простаты [16–18].

В эксперименте на мышах было показано, что терапия МФ и ингибиторами трансформирующего ростового фактора бета-1 (TGF- $\beta$ 1) в значительной степени снижают степень ЭМП и метастазирования при РМЖ. Обращает на себя внимание, что монотерапия как МФ, так и ингибиторами TGF- $\beta$ 1 показала значительно меньшую эффективность в рамках снижения уровня ЭМП, нежели совместное применение данных средств [19].

Одним из вариантов оценки степени ЭМП является измерение уровней эпителиальных и мезенхимальных биомаркеров, а также их соотношения. На фоне применения МФ установлено достоверное снижение уровня мезенхимальных биомаркеров (N-cadherin, Vimentin и TWIST) с одновременным повышением уровня эпителиальных биомаркеров (E-cadherin), что свидетельствует об обратном развитии ЭМП. Подобные результаты были получены в недавнем эксперименте на мышах при анализе эффективности терапии рака предстательной железы ингибитором андрогенных рецепторов энзалутамидом с использо-

ванием МФ в качестве дополнительной терапии. Известно, что препарат энзалутамид, используемый при лечении пациентов с раком предстательной железы, с одной стороны, достоверно снижает степень прогрессии опухоли, а с другой – повышает степень ЭМП раковых клеток и таким образом значительно увеличивает риск метастазирования. В данном эксперименте показано, что применение МФ ассоциировано с названным изменением соотношения биомаркеров ЭМП (снижением уровня мезенхимальных и повышением уровня эпителиальных биомаркеров); кроме того, энзалутамид-индуцированное метастазирование также было значительно ниже на фоне применения МФ. Данные воздействия объясняются ингибированием МФ оси TGF- $\beta$ 1/STAT3 [20]. Также МФ ингибирует ось циклооксигеназа-2/простагландин E2, что снижает активность сигнального белка STAT3 и тем самым уменьшает степень ЭМП при раке предстательной железы [21].

Помимо прочего важным механизмом действия МФ на опухолевые клетки, в частности при РМЖ и РЭ, является его способность оказывать влияние на эстрогеновые рецепторы. Еще в 2013 г. было отмечено, что у пациенток с РЭ, которые принимали МФ в связи с СД2, была значительно снижена степень экспрессии эстрогеновых рецепторов [22]. Выделяют 2 типа эстрогеновых рецепторов: альфа (ЭРа) и бета (ЭР $\beta$ ). С активацией ЭРа связаны процессы активации клеточной пролиферации, в то время как ЭР $\beta$  выполняет важную роль антагониста ЭРа и ингибирует эстрадиолзависимую пролиферацию клеток [23]. Недавно было обнаружено, что во многих типах опухолей МФ способен оказывать активирующее влияние на ЭР $\beta$  и блокировать ЭРа [24]. Кроме того, в эксперименте было также установлено, что применение МФ (особенно в сочетании с протопанаксидиолом, биологически активным веществом, выделенным из растений рода женьшень) способно ингибировать экспрессию также и ЭРа в некоторых типах клеток (Ishikawa, RL95-2) [25].

Все описанные выше механизмы могут оказывать разный вклад в суммарный эффект возможного влияния МФ на канцерогенез, при этом не до конца изучено, какой из механизмов является ведущим в тех или иных условиях.

#### **Метформин и метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты**

Механизмы эпигенетического контроля экспрессии ДНК не связаны с изменением непосредственно нуклеотидной последовательности и представляют собой перспективную основу для разработки противоопухолевых препаратов. К одному из подобных механизмов относится метилирование ДНК – перенос метильной группы с S-аденилметионина (SAM)

на С5-позицию цитозина в нуклеотидной паре цитозин-гуанин (СрG) посредством ферментов группы ДНК-метилтрансфераз (DNMT) с образованием 5-метилцитозина (5mC) и S-аденозилгомоцистеина (SAH) [26, 27]. СрG-участки распространены по всему геному, при этом появление тотального гипометилирования ДНК характерно как для нормальных клеток в процессе старения организма, так и для опухолевых клеток [28]. Основная часть ДНК-метилирования сконцентрирована в СрG-островках – участках со значительно повышенной частотой встречаемости СрG динуклеотидов, которые находятся в промоторах не менее половины белок-кодирующих генов организма млекопитающего. Таким образом, происходит регуляция экспрессии многих генов [29]. На современном этапе показана связь развития неопластических процессов с тотальным гипометилированием генома (повышающего экспрессию онкогенов и геномную нестабильность) в сочетании с локальным ген-специфическим гиперметилированием промоторных областей (снижающих репарацию ДНК и другие онкосупрессивные функции) [30].

В современных исследованиях отмечается влияние МФ на уровень глобального метилирования ДНК. При исследовании колоний опухолевых клеток под воздействием МФ было обнаружено увеличение концентрации SAM при уменьшении SAH, что свидетельствует об ингибировании активности DNMT. В то же время количество метилированных фрагментов ДНК 5mC было повышено, а значит, процесс глобального метилирования ДНК был простимулирован. Это объясняется опосредованным воздействием МФ на метилирование ДНК через AMPK-зависимую активацию SAH-гидролазы [31].

Эндогенные ретротранспозоны группы LINE занимают около 16,9 % генома человека, поэтому уровень их метилирования делает значительный вклад в уровень глобального метилирования ДНК [29, 30]. Систематический обзор метаанализов показал, что состояние гипометилирования ДНК по LINE-фрагментам ассоциировано с увеличением риска возникновения и степени злокачественности ряда опухолей [32]. На фоне приема МФ было отмечено увеличение степени метилирования LINE-фрагментов опухолевых клеток при РМЖ [31].

Определенную роль в стимулировании развития неопластических процессов занимает гиперметилирование промоторных участков онкогенов. Установлено, что повышенная экспрессия РНК H19 ингибирует активность микро-РНК let-7, что, в свою очередь, ассоциировано с увеличением риска метастазирования и неблагоприятным прогнозом практически всех видов рака [33]. Метформин влияет на сайт-специфическое гиперметилирование определенных генов, в частности гена синтеза H19, что опосредованно

снижает степень экспрессии последнего и, следовательно, повышает активность let-7, уменьшая опухолевую прогрессию. Подобный механизм был описан при РМЖ, РЭ, раке яичников [33, 34].

Изучение влияния МФ на процессы метилирования ДНК уже выявило ряд механизмов и закономерностей, но данная область знаний до сих пор остается малоизученной и открытой для научного поиска.

#### Метформин в клинических исследованиях

В последнее десятилетие было проведено большое количество клинических исследований по влиянию МФ на риск развития разных форм рака. Метаанализ 18 обзорных исследований (561 836 пациента) показал снижение заболеваемости всеми видами онкологических заболеваний на 27 % среди пациентов, получающих МФ [2]. Многие эпидемиологические исследования обнаружили положительное влияние МФ на профилактику и лечение рака [1, 3].

Известно, что РМЖ, РЭ, рак поджелудочной железы и колоректальный рак ассоциированы с СД2 и ожирением. Установлено, что пациенты с СД2, получавшие МФ, имели меньший риск развития рака различных локализаций, нежели пациенты без лечения МФ [36].

В ходе ретроспективного исследования было выявлено, что женщины с неэндометриоидным типом РЭ, страдающие СД2 и принимавшие МФ, имели лучшую общую выживаемость, чем пациентки сопоставимой группы без лечения МФ [37]. Кроме того, проведены работы, доказывающие, что на фоне применения МФ у пациенток с РЭ обнаруживается ингибирование клеточной пролиферации [38].

Проведенный в 2017 г. метаанализ продемонстрировал, что вспомогательная терапия МФ может стимулировать обратное развитие атипичной гиперплазии эндометрия в клетки с нормальной гистологической характеристикой, тем самым предотвращая развитие РЭ. В этом же исследовании было показано снижение клеточной пролиферации и улучшение общей выживаемости у женщин с РЭ на фоне применения МФ [39].

Метаанализ 10 обзорных исследований показал наличие связи между применением МФ и увеличением общей выживаемости, а также снижение уровня прогрессии у пациентов с РЭ. В том же исследовании было показано отсутствие подобных эффектов у других сахароснижающих препаратов [35].

Установлено, что МФ улучшает прогноз у пациенток с HER2-позитивным типом РМЖ [40]. Крупное исследование выявило, что у пациенток, принимавших МФ до появления РМЖ и продолжавших в дальнейшем прием препарата, были снижены риски проявления рака второй молочной железы

на 28 %, рецидива РМЖ – на 31 %, смертности от РМЖ – на 49 % [41]. Также в метаанализе 2015 г. исследователи обнаружили значительно более низкий уровень как общей, так и онкоспецифической смертности среди пациенток с РМЖ, получавших дополнительную терапию МФ [42].

Современные молекулярно-биологические технологии позволяют использовать параметр метилирования ДНК в качестве диагностического признака для разных видов неоплазий. В частности, разработана компьютерная программа на базе метода амплификации интерметилированных сайтов AIMS *in silico*, с помощью которой установлены ассоциации между рядом метилированных генов и фактом наличия РМЖ, РЭ, рака шейки матки, а также многих других онкологических заболеваний [43].

#### Генетическая предрасположенность к эффектам метформина

Большой интерес представляет поиск маркеров потенциальной чувствительности пациентов к разного рода эффектам бигуанида, а также последующая разработка методик и алгоритмов по оценке предполагаемого ответа.

В работе Ю.А. Сорокиной отмечены эффекты МФ в зависимости от полиморфизмов некоторых генов, среди которых гены эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS), 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (OGG1), белка p53. Выяснено, что за 3 мес терапии МФ СС- и СТ-аллели NOS дают больший метаболический эффект, значимую положительную динамику активности антиоксидантных ферментов, показателей перекисного окисления липидов; в то же время ТТ-аллель оказывает лучшее влияние на течение системного воспаления, показатели окислительной модификации белков (маркеры ранней деструкции белка). СС-полиморфизм OGG1 в ответ на терапию МФ показывает лучшие данные в отношении липидного спектра, перекисного окисления липидов по сравнению с СG-аллелью, которая связана с увеличением С-пептида; обе аллели показывают положительное влияние на антиоксидантную активность. СС-полиморфизм гена p53 ассоциирован с более выраженным гипогликемическим действием МФ, более сильное увеличение антиоксидантной активности, СG-аллель связана с уменьшением показателей окислительной модификации белков [44].

Л.М. Берштейн установил, что носительницы генотипа СС транспортера органических катионов 1 (OCT1\_R61C, rs12208357) в 87,5 % отвечают на терапию МФ в рамках его антипролиферативного эффекта, который оценивался по следующим суррогатным параметрам: уменьшение толщины эндометрия (сигнал М-эхо) при РЭ, снижение маммографической плотности молочных желез при их изначальном

уплотнении. В этой же работе отмечено, что гормонально-метаболическая эффективность приема МФ составляла 61,8 % наблюдений группы в целом, в то время как антинеопластический эффект данного бигуанида составлял 33,3 %. Наличие метаболического ответа на прием МФ у носительниц определенных полиморфных вариантов генов не всегда сочеталось с антинеопластическим действием препарата [45]. Обобщая вышесказанное, можно предположить, что метаболически позитивные полиморфизмы генов ответа на МФ могут не быть связанными с его антинеопластическим действием.

Важным направлением изучения действия бигуанида является поиск генетически обусловленных механизмов предрасположенности пациентов к его нежелательным эффектам со стороны желудочно-кишечного тракта. Установлено, что полиморфизмы органического транспортера катионов 1 (OCT1), а именно наличие А-аллели и/или 8bp вставки в гене *OCT1*, а также его аллели R61C и M420del, связаны с более высоким риском возникновения кишечных эффектов МФ [46, 47]. Также было обнаружено, что более высокая частота возникновения нежелательных эффектов ассоциирована со снижением экспрессии S-аллели в гене транспортера обратного захвата серотонина [48].

Уже найдены первые генные детерминанты эффективности МФ, а также риска возникновения его нежелательных эффектов. Но данное направление все еще остается малоизученным, а также возникает логичный вопрос о взаимосвязи разных эффектов бигуанида, например, может ли быть, что у пациентов с кишечными проявлениями наиболее выражен антипролиферативный эффект?

#### Возможные направления изучения антипролиферативных эффектов метформина

Метформин привлекает все большее внимание исследователей своими противоопухолевыми эффектами, сочетая в себе дешевизну и небольшое количество побочных эффектов. Однако существует ряд проблем и вопросов относительно данного препарата, требующих дальнейшего изучения.

Во-первых, большинство исследований представляют собой ретроспективный анализ информации о поведившемся лечении разных типов рака у пациентов с СД2. Требуется более тщательное изучение влияния МФ на риски и прогноз у пациентов без СД2 для подтверждения или опровержения эффективности препарата у данной группы пациентов, а также уточнения эффективной дозы МФ.

Во-вторых, неоднозначен вопрос об уровне плазменной концентрации МФ и ее эффективности. Концентрация МФ в плазме при назначении максимально допустимой терапевтической дозы составляет

около 11 мкмоль/л, при этом большинство лабораторных результатов, свидетельствующих об эффективности МФ получены *in vitro* в условиях его концентрации, почти в 50 раз превышающей плазменную (5–10 ммоль/л). Кроме того, в эксперименте также используются высокоуглеводистые среды (17,5 или 24 ммоль/л), притом что нормальная гликемия человека составляет менее 7 ммоль/л [49].

В-третьих, на современном этапе до конца не изучены механизмы действия МФ в организме человека. При этом важно определить основной путь антинеопластического действия МФ для дальнейшего поиска клинических маркеров эффективности препарата.

В-четвертых, МФ рассматривается как препарат адъювантной терапии, однако проведено недостаточное количество исследований его взаимодействия с химиопрепаратами для терапии рака, а также сочетания МФ и лучевой терапии.

В-пятых, существует ряд гормонально-метаболических и генетических маркеров предполагаемого ответа на терапию МФ, которые требуют дополни-

тельного изучения (в особенности генетические) в качестве потенциального метода отбора пациентов для адъювантной химиотерапии МФ.

### Заключение

Метформин уже давно применяется у пациентов с СД2 в качестве сахароснижающего лекарственного средства, однако в последние годы стали очевидны широчайшие перспективы для его использования в качестве препарата адъювантной терапии и химиопрофилактики рака. Оказывая влияние главным образом на активность АМПК-зависимого каскада, а также на степень глобального и локального метилирования ДНК, МФ способен снижать степень агрессивности опухолей разных видов, уменьшать риск метастазирования, улучшать прогноз пациентов с онкологическими заболеваниями.

Несмотря на большое количество данных об эффективности действия МФ на опухолевые процессы, остается большое количество нерешенных вопросов, которые требуют дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Sui X., Xu Y., Wang X. et al. Metformin: A Novel but Controversial Drug in Cancer Prevention and Treatment. *Mol Pharm* 2015;12(11):3783–91. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00577. PMID: 26430787.
- He H., Ke R., Lin H. et al. Metformin, an old drug, brings a new era to cancer therapy. *Cancer J*. 2015;21(2):70–4. DOI: 10.1097/PPO.000000000000103. PMID: 25815846.
- Morales D.R., Morris A.D. Metformin in Cancer Treatment and Prevention. *Ann Rev Med*. 2015;66(1):17–29. DOI: 10.1146/annurev-med-062613-093128. PMID: 25386929.
- Coperchini F., Loporati P., Rotondi M., Chiovato L. Expanding the therapeutic spectrum of metformin: From diabetes to cancer. *J Endocrinol Invest* 2015;38(10):1047–55. DOI: 10.1007/s40618-015-0370-z. PMID: 26233338.
- Tsilidis K.K., Kasimis J.C., Lopez D.S. et al. Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMJ* 2015;350(January):g7607. DOI: 10.1136/bmj.g7607. PMID: 25555821.
- Singh P., Alex J.M., Bast F. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-IR) signaling systems: Novel treatment strategies for cancer. *Med Oncol* 2014;31(1):805. DOI: 10.1007/s12032-013-0805-3. PMID: 24338270.
- Kato H., Sekine Y., Furuya Y. et al. Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via the downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;461(1):115–21. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.178. PMID: 25862373.
- Mughal A., Kumar D., Vikram A. Effects of Thiazolidinediones on metabolism and cancer: Relative influence of PPAR $\gamma$  and IGF-1 signaling. *Eur J Pharmacol* 2015;768:217–25. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.10.057. PMID: 26542126.
- Li W., Saud S.M., Young M.R. et al. Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. *Oncotarget*. 2015;6(10):7365–78. DOI: 10.18632/oncotarget.3629. PMID: 25812084.
- Rizos C.V., Elisaf M.S. Metformin and cancer. *Eur J Pharmacol*. 2013;705(1–3):96–108. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.02.038. PMID: 23499688.
- Angeles T.S., Hudkins R.L. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors. *Expert Opin Drug Discov*. 2016;11(12):1187–99. DOI: 10.1080/17460441.2016.1245286. PMID: 27701891.
- Gambhir S., Vyas D., Hollis M. et al. Nuclear factor kappa B role in inflammation associated gastrointestinal malignancies. *World J Gastroenterol* 2015;21(11):3174–83. DOI: 10.3748/wjg.v21.i11.3174. PMID: 25805923.
- Bijland S., Mancini S.J., Salt I.P. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin Sci* 2013;124(8):491–507. DOI: 10.1042/CS20120536. PMID: 23298225.
- Vansaun M.N. Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(8):1926–32. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0930. PMID: 23355630.
- Hirsch H.A., Iliopoulos D., Struhl K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(3):972–7. DOI: 10.1073/pnas.1221055110. PMID: 23277563.
- Qu C., Zhang W., Zheng G. et al. Metformin reverses multidrug resistance and epithelial-mesenchymal transition (EMT) via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*.

- 2014;386(1–2):63–71. DOI: 10.1007/s11010-013-1845-x. PMID: 24096736.
17. Zhang R., Zhang P., Wang H. et al. Inhibitory effects of metformin at low concentration on epithelial – mesenchymal transition of CD44+CD117+ ovarian cancer stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2015;6(1):262. DOI: 10.1186/s13287-015-0249-0. PMID: 26718286.
  18. Zhang J., Shen C., Wang L. et al. Metformin inhibits epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells: Involvement of the tumor suppressor miR30a and its target gene SOX4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):746–52. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.08.154. PMID: 25201727.
  19. Leonel C., Borin T.F., de Carvalho Ferreira L. et al. Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis by Combined TGFbeta Knockdown and Metformin Treatment in a Canine Mammary Cancer Xenograft Model. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2017;22(1):27–41. DOI: 10.1007/s10911-016-9370-7. PMID: 28078601.
  20. Liu Q., Tong D., Liu G. et al. Metformin reverses prostate cancer resistance to enzalutamide by targeting TGF-β1/STAT3 axis-regulated EMT. *Cell Death Dis* 2017;8(8):e3007. DOI: 10.1038/cddis.2017.417. PMID: 28837141.
  21. Tong D., Liu Q., Liu G. et al. Metformin inhibits castration-induced EMT in prostate cancer by repressing COX2/PGE2/STAT3 axis. *Cancer Lett* 2017;389:23–32. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.12.031. PMID: 28043910.
  22. Markowska A., Pawalowska M., Filas V. et al. Does Metformin affect ER, PR, IGF-1R, β-catenin and PAX-2 expression in women with diabetes mellitus and endometrial cancer? *Diabetol Metab Syndr* 2013;5(1):1–11. DOI: 10.1186/1758-5996-5-76. PMID: 24308813.
  23. Helguero L.A., Faulds M.H., Gustafsson J.Å., Haldosén L.A. Estrogen receptors alpha (ERα) and beta (ERβ) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 2005;24(44):6605–16. DOI: 10.1038/sj.onc.1208807. PMID: 16007178.
  24. Zhang J., Xu H., Zhou X. et al. Role of metformin in inhibiting estrogen-induced proliferation and regulating ERalpha and ERbeta expression in human endometrial cancer cells. *Oncol Lett* 2017;14(4):4949–56. DOI: 10.3892/ol.2017.6877. PMID: 29085506.
  25. Gu C.J., Cheng J., Zhang B. et al. Protopanaxadiol and metformin synergistically inhibit estrogen-mediated proliferation and anti-autophagy effects in endometrial cancer cells. *Am J Transl Res* 2017;9(9):4071–82. PMID: 28979682.
  26. Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2013;17(4/2):805–32. [Vanyushin B.F. Epigenetics today and tomorrow. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii* = Vavilov journal of genetics and breeding 2013;17(4/2):805–32 (In Russ.)].
  27. Moore L.D., Le T., Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 2013;38(1):23–38. DOI: 10.1038/npp.2012.112. PMID: 22781841.
  28. Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г., Оденбах Л.А., Ефремова И.В. Роль метилирования ДНК и состояния фолатного обмена в развитии патологических процессов в организме человека. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2013;4:39–43. [Shumatova T.A., Prikhodchenko N.G., Odenbakh L.A., Efremova I.V. Role of DNA methylation and folate metabolism in the development of pathological processes in the human body. *Tihoookeanskiy medicinskiy zhurnal* = Pacific Medical Journal 2013;4:39–43 (In Russ.)].
  29. Кабанов И.Н., Тищенко Л.И. Изменение метилирования ДНК повторяющихся последовательностей и однокопийных генов при онкологических и некоторых других заболеваниях человека. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина*. 2014;3(3):62–83. [Kabanov I.N., Tishchenko L.I. Changing the DNA methylation of repetitive sequences and single-copy genes in cancer and other human diseases. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta* = Bulletin of Saint Petersburg University. Medicine. 2014;3(3):62–83 (In Russ.)].
  30. Joyce B.T., Gao T., Zheng Y. et al. Prospective changes in global DNA methylation and cancer incidence and mortality. *Br J Cancer* 2016;115(4):465–72. DOI: 10.1038/bjc.2016.205.
  31. Cuyàs E., Fernández-Arroyo S., Verdura S. et al. Metformin regulates global DNA methylation via mitochondrial one-carbon metabolism. *Oncogene* 2017;1–8. DOI: 10.1038/nc.2017.367. PMID: 29059169.
  32. Barchitta M., Quattrocchi A., Maugeri A. et al. LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(10):e109478. DOI: 10.1371/journal.pone.0109478. PMID: 25275447.
  33. Zhong T., Men Y., Lu L. et al. Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHH axis. *Oncogene* 2017;36(17):2345–54. DOI: 10.1038/nc.2016.391. PMID: 27775072.
  34. Yan L., Zhou J., Gao Y. et al. Regulation of tumor cell migration and invasion by the H19/let-7 axis is antagonized by metformin-induced DNA methylation. *Oncogene* 2015;34(23):3076–84. DOI: 10.1038/nc.2014.236. PMID: 25088204.
  35. Guo J., Xu K., An M., Zhao Y. Metformin and endometrial cancer survival: a quantitative synthesis of observational studies. *Oncotarget* 2017;8(39):66169–77. DOI: 10.18632/oncotarget.19830. PMID: 29029501.
  36. Muszyńska-Oglaza A., Zarzycka-Lindner G., Olejniczak H. et al. Use of metformin is associated with lower incidence of cancer in patients with type 2 diabetes. *Endokrynol Pol.* 2017. DOI: 10.5603/EP.a2017.0054. PMID: 29022647.
  37. Nevadunsky N.S., Van Arsdale A., Strickler H.D. et al. Metformin use and endometrial cancer survival. *Gynecol Oncol.* 2014;132(1):236–40. DOI: 10.1016/j.ygyno.2013.10.026.
  38. Provinciali N., Lazzeroni M., Cazzaniga M. et al. Metformin: risk-benefit profile with a focus on cancer. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(10):1573–85. DOI: 10.1517/14740338.2015.1084289. PMID: 26359221.
  39. Meireles C.G., Pereira S.A., Valadares L.P. et al. Effects of metformin on endometrial cancer: Systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2017;147(1):167–80. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.07.120. PMID: 28760367.
  40. Kim H.J., Kwon H., Lee J.W. et al. Metformin increases survival in hormone receptor-positive, HER2-positive breast cancer patients with diabetes. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):64. DOI: 10.1186/s13058-015-0574-3. PMID: 25935404.
  41. Chen L., Chubak J., Boudreau D.M. et al. Diabetes Treatments and Risks of Adverse Breast Cancer Outcomes among Early-Stage Breast Cancer Patients: A SEER-Medicare Analysis. *Cancer Res.* 2017;77(21):6033–41. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0687. PMID: 28935814.
  42. Xu H., Chen K., Jia X. et al. Metformin Use Is Associated With Better Survival of Breast Cancer Patients With Diabetes: A Meta-Analysis. *Oncologist.* 2015;20(11):1236–44.

- DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0096.  
PMID: 26446233.
43. Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Немцова М.В. и др. Структурно-функциональный анализ опухолевых геномов и разработка тест-систем для ранней диагностики, прогноза течения и оптимизации терапии злокачественных новообразований. Вестник РАМН 2013;(9):7–14. PMID: 24624866. [Zaletaev D.V., Strel'nikov V.V., Nemtsova M.V. et al. Structural and functional analysis of tumor genomes and the development of test systems for early diagnosis, prognosis and cancer therapy optimization. Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013;(9):7–14. (In Russ.)].
44. Сорокина Ю.А. Фармакогенетические аспекты эффективности метформина при сахарном диабете 2 типа: дис. ... канд. биол. наук. Томск, 2016. 25 с. [Sorokina Yu.A. Pharmacogenetic aspects of Metformin efficacy in type 2 diabetes mellitus: PhD dissertation (Biology), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine. Tomsk, 2016 (In Russ.)].
45. Берштейн Л.М., Васильев Д.А., Иевлева А.Г. и др. Гормонально-метаболические и генетические маркеры чувствительности к метформину при диабете и раке: предсказание и реальность. Сахарный диабет 2014;1:21–8. DOI: 10.14341/DM2014121–28. [Bershteyn L.M., Vasilyev D.A., Ievleva A.G. et al. Hormonal, metabolic and genetic predictors of metformin efficacy in patients with diabetes mellitus and cancer. Saharniy diabet = Diabetes mellitus 2014;1:21–8 (In Russ.)].
46. Dujic T., Causevic A., Bego T. et al. Organic cation transporter 1 variants and gastrointestinal side effects of metformin in patients with Type 2 diabetes. Diabet Med. 2016;33(4):511–4. DOI: 10.1111/dme.13040. PMID: 26605869.
47. Tarasova L., Kalnina I., Geldnere K. et al. Association of genetic variation in the organic cation transporters OCT1, OCT2 and multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein genes with the gastrointestinal side effects and lower BMI in metformin-treated type 2 diabetes patients. Pharmacogenet Genomics 2012;22(9):659–66. DOI: 10.1097/FPC.0b013e3283561666. PMID: 22735389.
48. Dujic T., Zhou K., Tavendale R. et al. Effect of serotonin transporter 5-HTTLPR polymorphism on gastrointestinal intolerance to metformin: A GoDARTS study. Diabetes Care. 2016;39(11):1896–901. DOI: 10.2337/dc16-0706. PMID: 27493135.
49. Jara J.A., López-Muñoz R. Metformin and cancer: Between the bioenergetic disturbances and the antifolate activity. Pharmacol Res. 2015;101:102–8. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.06.014. PMID: 26277279.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

А.В. Шестаков / A.V. Shestakov: <https://orcid.org/0000-0001-9648-8255>

Т.В. Саприна / T.V. Saprina: <https://orcid.org/0000-0001-9011-8720>

И.А. Ануфрак / I.A. Anufrak: <https://orcid.org/0000-0002-8481-6562>

А.Л. Чернышова / A.L. Chernysheva: <https://orcid.org/0000-0002-8194-2811>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ПРОЦЕССА СУБЛИМАЦИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМОВ ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Е.В. Блынская<sup>1</sup>, С.В. Тишков<sup>1</sup>, К.В. Алексеев<sup>2</sup>, С.В. Минаев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

<sup>2</sup>Московский медицинский университет «РЕАВИЗ»;  
Россия, 107564 Москва, ул. Краснобогатырская, 2, стр. 2

**Контакты:** Сергей Валерьевич Тишков [sergey-tishkov@ya.ru](mailto:sergey-tishkov@ya.ru)

**Цель статьи** – рассмотреть методы математического моделирования для расчета этапа первичной сублимации как самого важного этапа в технологии лиофилизации. Представлены математические формулы, уравнения для расчета тепло- и массообменных процессов во время удаления 90 % всей влаги в лиофилизате. Продемонстрирована модель, в которой учтен вклад всех тепловых воздействий, в том числе переходный энергетический баланс, учитывающий перенос тепла через боковую стенку флакона и излучения, даже если они присутствуют в незначительном количестве. Математическая модель может быть использована для оптимизации цикла лиофилизации, а также в качестве инструмента технологического мониторинга (с применением датчиков на основе моделей). Модель, рассматриваемая в статье, является одномерной нестационарной моделью состояния, в которую введен правильный всеобъемлющий переходный баланс энергии, чтобы описать передачу тепла через стекло флакона. Результаты оценены с помощью экспериментальных данных. Уравнения, используемые в моделировании, описывают массовый и энергетический балансы в высушенном слое с учетом скорости адсорбции/десорбции воды на границе раздела фаз, массо- и теплопередачу на сублимационной границе раздела фаз, а также энергетический баланс передачи тепла в стенке флаконов с учетом расположения флаконов на полке и других факторов, влияющих на процесс сублимации. Сделаны выводы по представленным математическим моделям и дана характеристика направления процесса оптимизации первичной сублимации в технологии лиофилизации.

**Ключевые слова:** первичная сублимация, технология лиофилизации, математическое моделирование первичной сублимации, мономерная нестационарная модель состояния

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-20-28

## MATHEMATICAL MODELS OF THE PROCESS OF SUBLIMATION AND OPTIMIZATION OF LYOPHILIZATION MODES

E. V. Blynskaya<sup>1</sup>, S. V. Tishkov<sup>1</sup>, K. V. Alekseyev<sup>2</sup>, S. V. Minaev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>V.V. Zakusov Institute of Pharmacology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

<sup>2</sup>Moscow medical university "REAVIZ"; Bldg. 2, 2 Krasnobogatyrskaya St., Moscow 107564, Russia

**The purpose** of this study is to analyze methods of mathematical modeling for calculating the stage of primary sublimation, as the most important stage in lyophilization technology. Presented are mathematical formulas, equations for the calculation of heat and mass transfer processes, during the removal of 90 % of all frozen ice. A model is considered that takes into account the contribution of all thermal effects, including the transient energy balance, taking into account the heat transfer through the side wall of the vial and radiation, even if they are present in a small amount. The mathematical model can be used to optimize the lyophilization cycle, and also as tools for technological monitoring (using sensors based on models). The model considered in the article is a one-dimensional nonstationary state model in which the correct comprehensive transient energy balance has been introduced to describe the heat transfer through the glass of the vial, and the results are estimated using experimental data. The equations used in the simulation describe the mass and energy balances in the dried layer, taking into account the rate of adsorption/desorption of water at the interface, mass and heat transfer at the sublimation interface, as well as the energy balance of heat transfer in the wall of vials, shelf and other factors affecting the process of sublimation. Conclusions are made on the presented mathematical models and the characteristic of the direction of the process of optimization of primary sublimation in lyophilization technology is given.

**Key words:** primary sublimation, lyophilization technology, mathematical modeling of primary sublimation, monomeric nonstationary state model

### Введение

Лиофилизация – сложный поэтапный процесс, представляющий собой удаление воды и других растворителей из замороженного состояния путем создания вакуума. Данный метод приготовления лекарственных форм незаменим для термолабильных и конформационно неустойчивых субстанций. Также благодаря этому способу подготовки субстанций повышается их растворимость. Лиофилизация применяется для создания большого спектра лекарственных препаратов, пробиотиков, вакцин, ферментов, липосом [1–3] и многих других препаратов, в том числе пептидной и белковой природы. Лиофилизаты – перспективная лекарственная форма, области применения которой активно расширяются. При этом их изготовление энергозатратно и трудоемко, а технология чувствительна ко многим факторам, влияющим на качество получаемого продукта [4]. Выделяют 3 стадии технологического процесса лиофилизации: этап замораживания, этап первичной сублимации и этап досушивания. Во время замораживания происходит переохлаждение раствора с образованием кристаллов льда и дальнейшим затвердеванием жидкой фазы. Первичная сублимация – это этап лиофилизации, в течение которого из замороженного раствора под воздействием вакуума удаляется 90 % влаги. На этапе досушивания удаляется до значения, необходимого в конечном продукте, связанная влага.

Самым продолжительным, сложным и имеющим наибольшее количество критических значений является этап первичной сублимации [5]. Поэтому особое внимание следует уделить математическому моделированию процесса сублимации, так как это позволит детально рассчитать все параметры лиофилизации еще до экспериментального цикла.

Математические модели могут быть использованы для оптимизации цикла лиофилизации, а также в качестве инструментов технологического мониторинга (с применением датчиков на основе моделей) [6–8]. Модели для процессов первичной сублимации в технологии лиофилизации разрабатывались первоначально как многомерные уравнения.

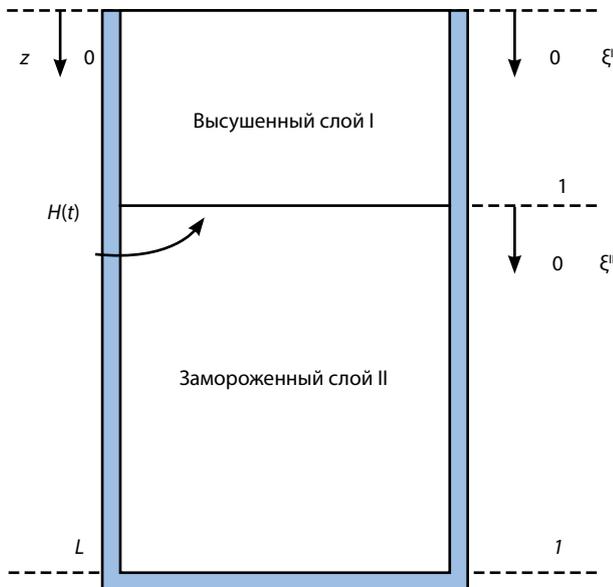
Многомерные модели для лиофилизации во флаконах довольно сложны, и их решение оказалось весьма трудоемким и не подходящим для приложения в реальном времени. Различные одномерные модели позже предлагались в литературе неоднократно [9–11], но ни одна из них не описала влияние передачи тепла в стенке флакона, хотя есть сведения, что это может иметь большое значение для лиофилизата во флаконе [12, 13]. На самом деле теплопроводность в стеклянной стенке редко принималась во внимание и в многомерных моделях, даже когда учитывалось излучение из внешней среды [14]. Не-

которые исследователи включили его с помощью метода конечных элементов для решения двумерной модели. Однако, несмотря на двумерный подход, для дальнейшей работы должны быть приняты многие упрощения. Например, молекулярная диффузия продумывается только в контексте массопереноса; парциальный градиент давления воды в высушенном слое предполагается линейным, и приемлемы несколько параметров установки [15, 16]. Конечно, позже разработали теоретическую двумерную модель, изучающую влияние нагрева излучением, но только для сублимации чистого льда, пренебрегая наличием слоя сухого продукта.

По этим причинам была разработана новая одномерная нестационарная модель состояния, в которую введен правильный всеобъемлющий переходный баланс энергии, чтобы описать передачу тепла через стекло флакона, а результаты оценены с помощью экспериментальных данных [17].

### Подробная одномерная модель

Модель разработана на основе ранее опубликованных работ, касающихся многомерного моделирования сублимации при типичном цикле лиофилизации в условиях радиальных тепловых градиентов, обычно небольших, даже когда берется в расчет излучение от окружающей среды, а также сильно ограничено межфазное искривление [18]. Это согласуется с результатами, полученными [19] в серии экспериментов, когда температура в нижней центральной части флакона была равна температуре нижнего края в пределах неопределенности измерений температуры ( $\pm 0,5$  °C). Конечно, многомерная модель для лиофилизации во флаконах является сложной и имеет очень трудоемкое численное решение. К тому же в последующих работах упущены радиальные градиенты, которые приняли сосредоточенный подход параметров вдоль радиальной координаты флакона. Позже были предложены различные одномерные модели, но ни одна из них не включала ни теплообмена с окружающей средой из-за излучения, ни теплопередачи через боковую стенку. Однако новая одномерная модель в этом разделе вводит полный энергетический баланс, описывая передачу тепла через стекло флакона в присутствии излучения из камеры лиофилизации. Схема флакона представлена на рис. 1. Перемешивающаяся граница раздела фаз, обозначаемая  $H(t)$ , считается плоской. Начало оси  $z$  задается на крышке флакона. В энергетическом балансе значение верхней секции усреднено  $\langle T \rangle$ , это же применяется для температуры, и соответствующее сопротивление теплопередаче должно использоваться для продукта в радиальном направлении. Это довольно трудоемко, но с учетом того, что радиальные градиенты сильно лимитированы,  $\langle T \rangle$  можно



**Рис. 1.** Схема геометрии флакона, построенная с помощью мерной системы координат и безразмерной системы координат, после осевой иммобилизации движущейся границы раздела фаз

заменить значением на оси с температурой с незначительной ошибкой.

Это позволит основывать модель температур на оси и на наружной поверхности флакона, для того чтобы просчитать полное радиальное сопротивление передаче тепла, используя «линейный закон» для значений температуры между стеклом и продуктом на границе раздела фаз как в сухом, так и в замороженном слое.

### Массовый баланс в высушенном слое

Далее представлено уравнение для водяного пара  $w$ , текущего непрерывно через высушенный слой:

$$\frac{\partial}{\partial t} \left( \frac{p_w}{T_i} \right) = \left( \frac{R}{\varepsilon_p M_w} \right) \frac{\partial N_w}{\partial z} - \left( \frac{R}{\varepsilon_p M_w} \right) \frac{\partial p_{sw}}{\partial t}, \quad (1)$$

где  $t$  — время, с;  $p_w$  — давление водяного пара, Па;  $T_i$  — температура высушенного слоя, К;  $R$  — константа идеального газа, Дж·кмоль<sup>-1</sup>·К<sup>-1</sup>;  $\varepsilon_p$  — пористость высушенного слоя;  $M_w$  — молекулярная масса водяного пара, кг·кмоль<sup>-1</sup>;  $N_w$  — поток массы водяного пара, кг·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>;  $z$  — осевая координата, м;  $p_{sw}$  — массовая концентрация сорбируемой воды, с  $0 < z < H(t)$ , где  $H(t)$  — положение раздела фаз между высушенными и замороженными слоями (см. рис. 1) и плотность газа выражена с использованием закона об идеальном газе (так как процесс осуществляется при очень низком давлении).

Аналогичный баланс может быть записан для инертного компонента с индексом «in», где, конечно, нет процессов адсорбции/десорбции:

$$\frac{\partial}{\partial t} \left( \frac{p_{in}}{T_i} \right) = - \left( \frac{R}{\varepsilon_p M_{in}} \right) \frac{\partial N_{in}}{\partial z}, \quad (2)$$

где  $0 < z < H(t)$ . Выражения для потоков материала изнутри через поры высушенного слоя задаются следующими уравнениями согласно модели газа со взвешенными частицами [20, 21]:

$$N_w = \frac{-M_w}{RT_1} (k_a \nabla p_w + k_b p_w \nabla p), \quad (3)$$

$$N_{in} = \frac{-M_{in}}{RT_1} (k_c \nabla p_{in} + k_b p_{in} \nabla p), \quad (4)$$

где

$$k_a = \left( \frac{1 - y_w (1 - \sqrt{M_w/M_{in}})}{D_{w,in}} + \frac{1}{K_w} \right)^{-1},$$

$$k_b = k_a \frac{k_{in}}{D_{w,in}} + \frac{k}{v}, \quad k_c = k_a \sqrt{\frac{M_w}{M_{in}}},$$

$$K_w = C_1 \sqrt{\frac{RT}{M_w}}, \quad K_{in} = C_1 \sqrt{\frac{RT}{M_{in}}}, \quad D_{w,in} \delta_{w,in} = \frac{\varepsilon_p}{\tau_p}, \quad (5)$$

где  $N$  — поток массы, кг·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>;  $M$  — молекулярная масса, кг·кмоль<sup>-1</sup>,  $k_a, k_b, k_c$  — коэффициенты диффузии;  $K$  — кнудсеновская диффузия, м<sup>2</sup>·с<sup>-1</sup>;  $C_1$  — постоянная, зависящая только от структуры пористой среды и обозначающая проницаемость относительного потока Кнудсена, м;  $D_{w,in}$  — эффективный коэффициент бинарной диффузии, м<sup>2</sup>·с<sup>-1</sup>;  $\delta_{w,in}$  — свободный коэффициент бинарной диффузии, м<sup>2</sup>·с<sup>-1</sup>;  $\tau_p$  — коэффициент извитости.

Скорость адсорбции/десорбции воды на границе раздела фаз между поверхностными порами и газовой фазой можно описать следующим уравнением:

$$\frac{\partial p_{sw}}{\partial t} = k_{sw,1} p_w (p_{sw}^* - p_{sw}) - k_{sw,2} p_w (p_{sw} - p_{sw}^*), \quad (6)$$

где  $p_{sw}^*$  представляет собой массовую концентрацию сорбируемой воды, чтобы водяной пар находился в равновесии в порах на границе раздела фаз. Значения  $k_{sw,1}$  и  $k_{sw,2}$  соответственно описывают адсорбцию и механизмы десорбции. Если десорбция преобладает, т. е. для  $k_{sw,1} p_w (p_{sw}^* - p_{sw}) \ll k_{sw,2} p_w (p_{sw} - p_{sw}^*)$ , уравнение (6) можно упростить с учетом только скорости десорбции. Другие законы, описывающие механизм десорбции, были предложены А. I. Liapis и R. Bruttini (1995) [22].

При времени  $t = 0$  высушенный слой отсутствует, а парциальное давление воды  $p_w^0$  и инертного газа  $p_m^0$  обнаруживаются в камере лиофильной сушки. Для времени  $t > 0$  перемещение границы фаз присутствует в осевом положении по  $z = H(t)$ , где функция  $p_w(T_i)$  представляет термодинамическое равновесие между замерзшей водой и паром. В последнем случае  $T_i$  – температура движущегося фронта. Пока отступает граница раздела фаз во время сублимации, она оставляет пористый слой с начальной концентрацией связанной воды  $p_{sw}^0$ . Начальные и граничные условия для уравнений равновесия математически выражены следующим образом:

$$t = 0, z = 0, p_w = p_w^0 \quad (7)$$

$$t = 0, z = 0, p_m = p_m^0 \quad (8)$$

$$t > 0, z = 0, p_w = p_{w,0} \quad (9)$$

$$t > 0, z = 0, p_m = p_0 \quad (10)$$

$$t > 0, z = H(t), p_w = p_w(T_i) \quad (11)$$

$$t > 0, z = H(t), \left. \frac{\partial p_{in}}{\partial z} \right|_{z=H(t)} \quad (12)$$

$$t > 0, z = H(t), p_{sw} \Big|_{z=H(t)} = p_s \quad (13)$$

### Энергетический баланс в высушенном слое

Энергетический баланс в высушенном слое учитывает пористость продукта и газ, протекающий через него как псевдогомогенную систему. Таким образом, используют эффективные свойства, учитывая вклад 2 различных фаз:

$$\frac{\partial c}{\partial t} \left( \frac{k_{1,e}}{p_{i,b} c_{p,1,e}} \right) \frac{\partial^2 T_1}{\partial z^2} - \left( \frac{H_{1,int}}{p_{1,e} C_{p,1,e}} \frac{2}{R_{gl,int}} \right) (T_1 - T_{1,gl}) - \left( \frac{C_{p,g}}{p_{1,e} C_{p,1,e}} \right) \frac{\partial}{\partial z} (T_1 N_{tot}) + \left( \frac{\Delta H_w}{p_{1,e} C_{p,1,e}} \right) \frac{\partial p_{sw}}{\partial t} \quad (14)$$

с  $0 < z < H(t)$ , где общая масса потока  $N_{tot}$  дается как сумма потока пара  $N_w$  и инертного потока  $N_m$ ;  $k$  – теплопроводность, Дж·м<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>·К<sup>-1</sup>. Тепло сопротивления переносу в радиальном направлении можно отнести к теплопроводности флакона и продукта в объединенном уравнении, пренебрегая кривизной стенки флакона:

$$\frac{1}{H_{1,int}} = \frac{d}{\lambda_{gl}} + \frac{R_{gl,int}}{k_{1,e}}, \quad (15)$$

где  $h$  – коэффициент теплопередачи, Дж·м<sup>2</sup>·с<sup>-1</sup>·К<sup>-1</sup>;  $d$  – толщина стекла флакона, м;  $\lambda_{gl}$  – теплопро-

водность стекла флакона, Дж<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>·К;  $R_{gl}$  – радиус флакона, м.

Как уже обсуждалось, для учета всех сопротивлений продукта и стенки флакона необходимо принять в расчет возможную усадку продукта, которая создаст дополнительное сопротивление. По мере того как температура на оси и на внешней стенке, которая используется для расчета вклада излучения, появляется в предыдущих уравнениях, дополнительные сопротивления могут быть вставлены в уравнение (15), как предложили некоторые исследователи [23, 24].

Начальные условия и условия на границе для уравнения (14):

$$t = 0, z = 0, T_1 = T^0, \quad (16)$$

$$t > 0, z = 0, -k_{1,e} \left. \frac{\partial T_1}{\partial z} \right|_{z=0} = \sigma F (T_{shel}^4 - T_{1,z=0}^4), \quad (17)$$

$$t > 0, z = H(t), T_{1,z=0} = T_i, \quad (18)$$

где  $F$  – форм-фактор для теплообмена излучением;  $\sigma$  – постоянная Больцмана, Вт·м<sup>-2</sup>·К<sup>-4</sup>.

Граничное условие (17) описывает теплообмен излучения на верхней высушенной поверхности. Если резиновая пробка, которая служит относительно плохим проводником тепла, помещается в пробирку, то высохший слой можно считать практически изолированным в верхней части. В соответствии с этим предположением условие (17) станет  $D_{z|z=0}$ .

### Энергетический баланс в замороженном слое

Теплопроводность в замерзшей массе и накопление тепла, так же как и теплообмен со стороны флакона, рассматриваются в уравнении энергетического баланса для замороженного продукта

$$\frac{\partial T_{II}}{\partial t} = \left( \frac{k_{II}}{p_{II} c_{p,II}} \right) \frac{\partial^2 T_{II}}{\partial z^2} - \left( \frac{h_{II,int}}{p_{II} c_{p,II}} \frac{2}{R_{gl,inf}} \right) (T_{II} - T_{II,gl}) \quad (19)$$

с  $H(t) < z < L$ . Аналогично отношению (15) внутреннего тепла коэффициенту передачи  $h_{II,int}$  задаются значения

$$\frac{1}{h_{II,int}} = \frac{d}{\lambda_{gl}} + \frac{R_{gl,int}}{k_{II}}. \quad (20)$$

Заключения, сделанные для уравнения (15), справедливы и в данном случае; влияние усушки может быть уместно в случае чистого льда, но для замороженного раствора должно быть незначительно. Начальные и граничные условия для уравнения (19):

$$t = 0, 0 < z < L, T_{II} = T^0, \quad (21)$$

$$t > 0, z = H(t), T_{II|z=H(t)} = T_p, \quad (22)$$

$$t > 0, z = L, k_{II} \frac{\partial T_{II}}{\partial z} \Big|_{z=L} = K_v (T_{shelf} - T_{II|z=L}), \quad (23)$$

$$\frac{1}{K_v} = \frac{d_B}{\lambda_{gl}} + \frac{1}{h_v}, \quad (24)$$

где  $K_v$  – общий коэффициент теплопередачи, Дж·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>·К<sup>-1</sup>;  $d_B$  – толщина стеклянного дна флакона, м.

Можно рассмотреть 2 разных случая:

1) если ампулы расположены непосредственно на полке, в состоянии (23) соприкосновения полки с флаконом, коэффициент теплопередачи  $K_v$  можно рассчитать как сопротивление стекла на дне флакона в сочетании с внешним сопротивлением теплопередаче  $1/h_v$ , что может быть обозначено как сумма вкладов конвективного тепла и излучения [15, 16]:

$$h_v = \frac{k_a \Lambda_0 p (273,15/T_g)^{1/2}}{k + l_a \Lambda_0 p (273,15/T_g)^{1/2}} + \frac{\sigma(T_{shelf}^2 + T_{gl}^2)(T_{shelf} + T_{gl})}{1 + ((e_{shelf} + 1)/e_{shelf}) + ((e_{gl} + 1)/e_{gl})}, \quad (25)$$

где  $\Lambda_0$  – свободная молекулярная теплопроводность газа при 273,15 К;  $T_g$  равно среднему значению температуры между нижней поверхностью флакона и поверхностью полки;  $T_{gl}$  – температура нижней поверхности флакона;  $\alpha$  – коэффициент размещения с учетом эффективности передачи энергии между молекулами газа и эффективной поверхностью стекла и полки;  $k$  – средняя теплопроводность газа в температурном интервале  $T_{shelf} - T_{gl}$ .

В уравнении (25) прямое проведение от полки к стеклу в точках контакта не учитывается. Если этим вкладом нельзя пренебречь, дополнительный коэффициент тепла  $h_{dc}$  должен быть добавлен к  $h_v$ ;

2) если пробирки помещаются в лоток, который затем выгружается на полку, это дополнительное сопротивление должно быть рассмотрено в уравнении (24). Уравнение (25) будет использовано для коэффициента теплопередачи флакона/подноса, заменяя  $T_{tray}$  на  $T_{shelf}$ .

### Массо- и теплоперенос на сублимационной границе раздела фаз

Скорость продвижения сублимационной границы фаз  $v_z$  связана со скоростью сублимации и может быть определена через материальный баланс прохождения пара через границу раздела фаз:

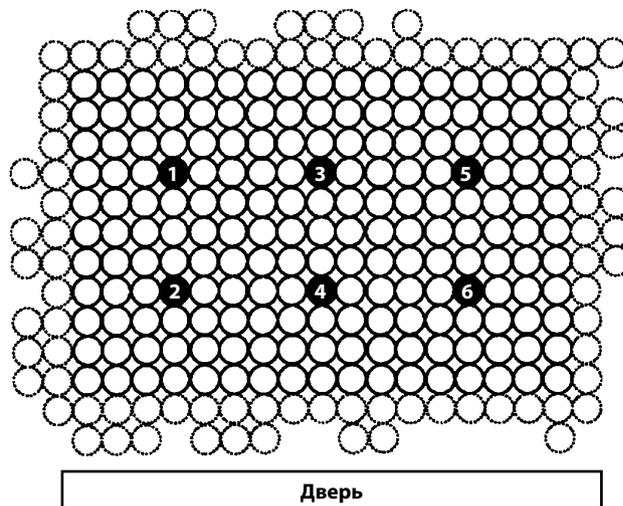


Рис. 2. Схема расположения флаконов. Термопары, вставленные во флаконы, закрашены черным цветом. Пунктирными обводками обозначены флаконы, находящиеся на границе

$$N_{w|z=H} S = -p_{II} v_z S + p_{I,e} v_z S. \quad (26)$$

Уравнение (26) указывает, что разница между скоростью исчезновения массы замороженного слоя и скоростью образования массы высушенного слоя равна скорости потока пара на границе раздела фаз. Если скорость передвижения границы раздела фаз выражается как  $v_z = dH/dt$ , динамический рост границы раздела фаз во время сублимации можно записать как

$$\frac{\partial H}{\partial t} = \frac{-1}{p_{II} - p_{I,e}} N_w|z=H \quad (27)$$

при  $z = H(t)$  и начальном условии  $h = 0$ , когда  $t = 0$ .

Тепловые балансы в замороженном продукте и в пористом слое соединяются в движущемся фронте границы раздела фаз уравнением, которое дает изменение энтальпии через представленную границу:

$$c_{p,g} T_i N_{w|z=H} S + \Delta H_s N_{w|z=H} S = -k_{II} \frac{\partial T_{II}}{\partial z} \Big|_{z=H} S + k_{I,e} \frac{\partial T_I}{\partial z} \Big|_{z=H} S - p_{II} c_{p,II} v_z T_i S + p_{I,e} c_{p,I,e} v_z T_i S \quad (28),$$

где  $C_p$  – удельная теплоемкость.

При разработке уравнения (28) учитывалось влияние разных факторов: физическое тепло водяного пара, покидающего границу раздела фаз, и скрытое тепло, связанное с изменением проводимости фазы в слоях I и II и изменениями в теплоемкости продукта из-за конвертации бесконечной части замороженной массы до высушенной. Получено объединяющее уравнение (26)–(28) с окончательной формой энергетического баланса при движении границы фаз:

$$-k_{II} \frac{\partial T_{II}}{\partial z} \Big|_{z=H} + k_{I,e} \frac{\partial T_I}{\partial z} \Big|_{z=H} - N_{w|z=H} [\Delta c_p T_i + \Delta H_s] = 0 \quad (29)$$

$$c z = H(t), \text{ где } T_i = T_{I|z=H(t)} = T_{II|z=H(t)}$$

$$\text{и } \Delta c_p = c_{p,g} - ((p_{II} c_{p,II} - p_I c_{p,I,e}) / (p_{II} - p_{I,e})).$$

### Энергетический баланс во флаконе

Теплообмен во флаконе моделируется с учетом условий накопления и проводимости. Передача тепла излучением от окружающей среды камеры и внутренин теплообмен с продуктом учитываются в разработке уравнений баланса. Для части флакона, находящегося в контакте с высушенным продуктом, мы получаем

$$\frac{\partial T_{I,gl}}{\partial t} = \left( \frac{\lambda_{gl}}{p_{gl} c_{p,gl}} \right) \frac{\partial T_{I,gl}}{\partial z^2} + \left( \frac{h_{I,int}}{p_{gl} c_{p,gl}} \frac{2R_{gl,int}}{R_{gl,ext}^2 - R_{gl,int}^2} \right) + \left( \frac{1}{p_{gl} c_{p,gl}} \frac{2R_{gl,ext}}{R_{gl,ext}^2 - R_{gl,int}^2} \right) \sigma F (T_{I,gl}^4 - T_w^4), \quad (30)$$

при  $0 < z < H(t)$ . В то время как часть флакона контактирует с замороженным слоем, уравнение теплового баланса достигается отношением

$$\frac{\partial T_{I,gl}}{\partial t} = \left( \frac{\lambda_{gl}}{p_{gl} c_{p,gl}} \right) \frac{\partial^2 T_{I,gl}}{\partial z^2} + \left( \frac{h_{II,int}}{p_{gl} c_{p,gl}} \frac{2R_{gl,int}}{R_{gl,ext}^2 - R_{gl,int}^2} \right) \times (T_{II} - T_{II,gl}) + \left( \frac{1}{p_{gl} c_{p,gl}} \frac{2R_{gl,ext}}{R_{gl,ext}^2 - R_{gl,int}^2} \right) \sigma F (T_{II,gl}^4 - T_w^4) \quad (31)$$

при  $H(t) < z < L$ . Для флаконов, расположенных в центре полки предполагается, что они полностью окружены соседними флаконами (рис. 2), поэтому хорошо защищены от теплообмена с окружающей средой. В этом случае значениями теплового излучения в уравнениях (30) и (31) можно пренебречь, что приводит к совершенно изолированной системе, отдаленной от бортика камеры. И наоборот, значения, показывающие излучение, нужно принять во внимание, имитируя флаконы, находящиеся на краю полки, которые не экранируются соседними флаконами.

В начале фазы высушивания предполагается, что продукт находится в тепловом равновесии, т. е. при такой же начальной температуре  $T^0$ . В верхней и в нижней частях флакона граничные условия аналогичны условиям, заданным для достижения энергетического баланса в замороженном слое. В соответствии с движущейся границей раздела фаз  $z = H(t)$  температура в боковой стенке флакона и ее первая производная вводятся как непрерывная функция

от  $z$ . Начальные и граничные условия могут быть записаны следующим образом:

$$t = 0, 0 < z < L, T_{I,gl} = T_{II,gl} = T^0, \quad (32)$$

$$t > 0, z = 0, \lambda_{gl} \frac{\partial T_{I,gl}}{\partial z} \Big|_{z=0} = \sigma F (T_{shelf}^4 - T_{I,gl|z=0}^4), \quad (33)$$

$$t > 0, z = H(t), T_{II|z=H(t)} = T_{II,gl|z=H(t)}, \quad (34)$$

$$t > 0, z = H(t), \frac{\partial T_{I,gl}}{\partial z} \Big|_{z=H(t)} = \frac{\partial T_{II,gl}}{\partial z} \Big|_{z=H(t)}, \quad (35)$$

$$t > 0, z = L, \lambda_{gl} \frac{\partial T_{II,gl}}{\partial z} \Big|_{z=L} = K_v (T_{shelf} - T_{II,gl|z=L}), \quad (36)$$

### Расчет результирующего уравнения

Уравнения модели определяют проблему движущейся границы, также известную как проблема Стеффана. Решение результирующей системы уравнений будет подразумевать использование пространственной сетки, развивающейся во времени, поскольку положение сублимационной границы раздела фаз не фиксировано. Чтобы преодолеть эту проблему, можно использовать математический метод, состоящий в осевой иммобилизации подвижной межфазной границы. После процедуры, предложенной Р. Sheehan и А. I. Liapis (1998) [16], иммобилизацию можно выполнить путем введения 2 осевых переменных  $-\xi^I, \xi^{II} \in [0, 1]$ , получая таким образом фиксированную во времени пространственную сетку:

$$\xi^I = \frac{z}{H(t)}, 0 < z < H(t), \quad (37)$$

$$\xi^{II} = \frac{z - H(t)}{L - H(t)}, H(t) < z < L, \quad (38)$$

где  $L$  – общая толщина продукта, м.

Для решения задачи каждая функция  $(z, t)$ , а именно температуры, давления и т. д. и их производные преобразуются соответственно изменению координат по уравнениям (37) и (38).

Численное решение задачи можно выполнить, дискретизируя пространственные области системы и преобразуя таким образом систему PDE в систему ODE. Ортогональный метод коллокаций был использован для вычисления решения в узлах дискретизированной области: неизвестное решение дифференциального уравнения расширяется как глобальный интерполятор, такой как тригонометрическая или полиномиальная функция [22, 23]:

$$f(x) \cong \sum_{j=0}^{n+1} f(x_j) l_j(x), \quad (39)$$

где  $x_0$  и  $x_{n+1}$  – точки, где граничные условия определены;  $\{x_j\}$  – набор из  $n$  различных интерполяционных узлов;  $l_j$  – лагранжевы интерполяционные многочлены степени  $n$ , удовлетворяющие условию

$$l_j(x_j) = \delta_{ij}, \quad (40)$$

и, следовательно, определяющиеся как

$$l_j(x) = \prod_{i=1, i \neq j}^n \frac{x - x_i}{x_j - x_i}. \quad (41)$$

Наилучшим выбором для интерполяции узлов являются корни ортогональных многочленов, такие как многочлены Якоби, Лагерра и Эрмита. Для конечной области, как и в случае переменных для нашей задачи, подходящий выбор — многочлены Якоби  $P_N^{(A,B)}$  ( $A > -1$ ,  $B > -1$ ). В результате предыдущих рассуждений пространственная область описывается координатами (37) и (38), они дискретизированы следующим образом:

– домен I ( $0 < \xi^I < 1$ ):  $N^I$  осевые узлы,  $\{\xi_k^I\}_{k=1}^{N^I}$ , заданные корнем  $P_{N^I}^{(1,1)}$ ;

– домен II ( $0 < \xi^II < 1$ ):  $N^{II}$  осевые узлы,  $\{\xi_k^{II}\}_{k=1}^{N^{II}}$ , заданные корнем  $P_{N^{II}}^{(1,1)}$ .

Найдено, что ряд узлов  $N^I = N^{II} = 8$ , что дает независимые сетки, тогда как выбор параметров ( $a$ ,  $b$ ) выполнен в соответствии с геометрическими соображениями [9]. Что касается временной интеграции дискретизированной системы ODE, были использованы формулы многоэтапного метода, основанного на обратном дифференцировании.

Результаты сравнения моделей с экспериментальными результатами, полученными с помощью серии циклов лиофилизации, проведенной в Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), CRE Lyon (Франция) в пилотном блоке Usifroid, подтверждают математические уравнения, обоснования и допущения, используемые при выведении представленных моделей [25].

### Оптимизация процесса

Давление в камере и температура нагрева полки сублимационной сушки являются двумя наиболее важными рабочими переменными процесса, а масса и теплопередача строго зависят от этих переменных. Кроме того, изменение действующих условий для улучшения теплообмена может препятствовать массопереносу, так как давление оказывает противоположное влияние на эти два явления. Тем не менее оно должно быть оптимальным в рабочих условиях, чтобы минимизировать время первичной сушки.

С этой целью принята детальная мономерная модель для теоретического исследования влияния основных рабочих переменных во время сушки, чтобы определить условия, которые минимизируют время высыхания. Можно заметить, что для температуры полки  $T_{shelf}$  может быть найдено условие оптимального давления, которое обеспечивает минимальное время высыхания. Если лиофилизация проходит при очень глубоком вакууме, то увеличение давления приводит к уменьшению времени высыхания, поскольку улучшается теплопередача. Однако когда давление поднимается выше определенного значения, время сушки начинает увеличиваться, поскольку прижимное давление для массопереноса становится слишком слабым и сублимация происходит медленно. Неконтролируемое увеличение температуры опасно тем, что продукт может подвергаться денатурации в местах, где проходит граница раздела фаз [25–27].

### Заключение

Математическое моделирование этапа первичной сушки процесса лиофилизации имеет основополагающее значение для оптимизации и теоретического расчета основных параметров (в частности рассмотрена одномерная модель нестационарного состояния).

Предложено ввести в модель переходный энергетический баланс, не учтенный ранее, который описывает передачу тепла вдоль стенок флакона. Оценены экспериментальные данные по этой модели, полученные во время пилотной лиофилизации [27].

Показана важность таких температурных вкладов, как перенос тепла через боковую стенку флакона и излучение, даже если они присутствуют в незначительном количестве, поскольку при моделировании процессов сушки сокращается время сушки и достигается более высокая температура продукта.

Подробная модель лучше подходит для предсказания динамики фазы процесса первичной сушки, позволяет исследовать условия эксплуатации, а именно температуры полки и давления в камере, чтобы свести к минимуму продолжительность первичного этапа сублимации.

Число переменных, участвующих в подробной модели, и сложность математической формулировки не позволяют использовать ее для контроля лиофилизации непосредственно во время процесса. Поэтому в дальнейшем для контроля и мониторинга процессов в реальном времени должны быть разработаны переходная и упрощенные модели.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гулякин И.Д., Хашем А., Николаева Л.Л. и др. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокразола ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):55–60. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60. [Gulyakin I.D., Hashem A., Nikolaeva L.L. et al. Development of a new technology for the preparation of a dosage form for the intravenous administration of an indole carbazole derivative, LHS-1208. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(2):55–60 (In Russ.)].
2. Ланцова А.В., Котова Е.А., Санарова Е.В. и др. Разработка лиофилизированной липосомальной лекарственной формы цифелина. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;14(2):79–84. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-5-39-42. [Lantsova A.V., Kotova E.A., Sanarova E.V. et al. Development of a lyophilized liposomal drug form of cipheline. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(2):79–84 (In Russ.)].
3. Аршинова О.Ю., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2013;2:20–5. [Arshinova O.Yu., Oborotova N.A., Sanarova E.V. Auxiliary substances in the technology of lyophilization of drugs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Development and registration of medicines* 2013;2:20–5. (In Russ.)].
4. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(1):6–11. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. Technological approaches to improving the process of lyophilization of protein and peptide drugs. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(1):6–11 (In Russ.)].
5. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В., Марахова А.И. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков. *Фармация* 2017;66(1):14–8. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V., Marakhova A.I. Auxiliary substances in the technology of lyophilization of peptides and proteins. *Farmatsiya = Pharmacy* 2017;66(1):14–8 (In Russ.)].
6. Barresi A.A., Pisano R., Fissore D. et al. Monitoring of the primary drying of a lyophilization process in vials. *Chem Eng Proc: Process Intensification* 2009;48(1):408–23. DOI: 10.1016/j.cep.2008.05.004.
7. Genin N., Rene F., Corrieu G. A method for on-line determination of residual water content and sublimation end-point during freeze-drying. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 1996;35(4):255–63. DOI: 10.1016/0255-2701(95) 04131-1.
8. Pikal M.J. Use of laboratory data in freeze-drying process design: heat and mass transfer coefficients and the computer simulation of freeze-drying. *J Parenter Sci Technol* 1985;39:115–39. DOI: 10.1208/pt050458.
9. Millman M.J., Liapis A.I., Marchello J.M. An analysis of the lyophilisation process using a sorption sublimation model and various operational policies. *AIChE J* 1985;31(10):1594–604. DOI: 10.1002/aic. 690311003.
10. Pisano R., Fissore D., Velardi S.A., Barresi A.A. In-line optimization and control of an industrial freeze-drying process for pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010;99(11): 4691–709. DOI: 10.1002/jps.22166.
11. Ybema H., Kolkman-Roodbeen L., te Booij M.P., Vromans H. Vial lyophilization: calculations on rate limiting during primary drying. *Pharm Res* 1995;12(9):1260–3. DOI: 10.1023/A:1016248918285.
12. Brülls M., Rasmuson A. Heat transfer in vial lyophilization. *Int J Pharm* 2002;246(1): 1–16. DOI: 10.1016/S0378-5173(02) 00353-8. PMID: 12270604.
13. Hottot A., Peczkalski R., Vessot S., Andrieu J. Freeze drying of pharmaceutical proteins in vials: modeling of freezing and sublimation steps. *Drying Technol* 2006;24:561–70. DOI: 10.1080/07373930600626388.
14. Zhai S., Su H., Taylor R., Slater K.H. Pure ice sublimation within vials in a laboratory lyophiliser; comparison of theory with experiments. *Chem Eng Sci* 2005;60:1167–76. DOI: 10.1016/j.ces.2004.09.078.
15. Trelea I.C., Passot S., Fonseca F. et al. An interactive tool for the optimization of freeze-drying cycles based on quality criteria. *Drying Tech* 2007;25(5):741–51. DOI: 10.1080/07373930701370100.
16. Sheehan P., Liapis A.I. Modeling of the primary and secondary drying stages of the freeze-drying of pharmaceutical product in vials: numerical results obtained from the solution of a dynamic and spatially multidimensional lyophilisation model for different operational policies. *Biotechnol Bioeng* 1998;60(3):712–28. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19981220)60:6<712::AID-BIT8>3.0.CO;2-4.
17. Mason E.A., Malinauskas A.P., Evans R.B. Flow and diffusion of gases in porous media. *J Chem Phys* 1967; 46(8):3199–216. DOI: 10.1063/1.1841191.
18. Kast W., Hohenthanner C.R. Mass transfer within the gas-phase of porous media. *Int J Heat Mass Transfer* 2000;43(5):807–23. DOI: 10.1016/S0017-9310(99)00158-1.
19. Liapis A.I., Bruttini R. Freeze-drying of pharmaceutical crystalline and amorphous solutes in vials: Dynamic multi-dimensional models of the primary and secondary drying stages and qualitative features of the moving interface. *Drying Tech* 1995;13(1–2): 43–72. DOI: 10.1080/07373939508916942.
20. Sadikoglu H., Liapis A.L., Crasser O.K., Bruttini R. Estimation of the effect of product shrinkage on the drying times, heat input and condenser load of the primary and secondary drying stages of the lyophilization process in vials. *Drying Tech* 1999;17(10): 2013–35. DOI: 10.1080/07373939908917670.
21. Canuto C., Hussaini M.Y., Quarteroni A. et al. *Spectral methods in fluid dynamics*. New York: Springer Science & Business Media, 2012. 551 p. DOI: 10.1007/978-3-540-52205-8.
22. Fornberg B. *A practical guide to pseudospectral methods*. Cambridge: Cambridge university press, 1998; 1. 231 p. DOI: 10.1017/S002211209722848X.
23. Funaro D. *Polynomial approximation of differential equations*. Berlin: Springer Science & Business Media, 2008; 8. 305 p.
24. Hamdami N., Monteau J.Y., Le Bail A. Effective thermal conductivity of a high porosity model food at above and sub-freezing temperatures. *Int J Refrig* 2003;26(7):809–16. DOI: 10.1016/S0140-7007(03)00051-3.
25. Velardi S.A., Barresi A.A. Development of simplified models for the freeze-drying process and investigation of the optimal operating conditions. *Chem Eng Res*

- Design 2008;86:9–22.  
DOI: 10.1016/j.cherd.2007.10.007.
26. Sandall O.C., King C.J., Wilke C.R.  
The relationship between  
transport properties and rates  
of freeze-drying of poultry meat. *AIChE  
Journal* 1967;13(3):428–38.  
DOI: 10.1002/aic.690130309.
27. Hill J.E., Sunderland J.E.  
Sublimation-dehydration  
in the continuum, transition and free-  
molecule flow regimes.  
*Int J Heat Mass Transfer.*  
1971;14(4):625–38.  
DOI: 10.1016/0017-9310(71)90011-1.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

С.В. Тишков / S.V. Tishkov: <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

## ДИАЛОГ МЕЖДУ АУТОФАГИЕЙ И ЖЕЛЕЗОМ ПРИ ПРОГРЕССИИ МЕЛАНОМЫ

А.А. Вартамян, О.С. Булова, Ю.А. Хоченкова, М.А. Барышникова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

**Контакты:** Амалия Арташевна Вартамян zhivotov57@mail.ru

**Введение.** Аутофагия – катаболический процесс удаления отработанных органелл, долгоживущих белков и продуктов распада с помощью двухмембранных фагосом – в опухолевых клетках имеет патологически повышенную активность, и неэффективность химио- и радиотерапии во многом связывают с активацией аутофагии. Среди металлов, необходимых живому организму, железо занимает особое место. Стремительный рост злокачественной опухоли требует значительно большего расхода железа, нежели метаболизм нормальных клеток.

**Цель исследования** – выявление взаимосвязи между аутофагией и железом в прогрессии опухоли.

**Материалы и методы.** В работе были использованы 2D- и 3D-культивирование клеток меланомы с высокой экспрессией CD71 (mel P and mel Z) и с низкой экспрессией CD71 (mel Gus and mel Ibr), проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия.

**Результаты.** Захват железа опухолевой клеткой происходит посредством транслокации комплекса «трансферрин/CD71» в цитоплазму с последующей диссоциацией железа из комплекса. Хелатор железа в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71 снижал базовый уровень аутофагии, в то время как донор железа повышал базовый уровень аутофагии. В присутствии донора железа клетки меланомы формировали в 3D-культуре сосудистоподобные структуры с многочисленными разрывами в сети. Хелатор железа сохранял способность клеток меланомы мигрировать и узнавать друг друга, формирование сосудистоподобных структур не наблюдалось. Аналогичная закономерность сохранялась и в клетках меланомы с низкой экспрессией CD71. В контрольных клетках меланомы экспрессия CD105 была значительно выше в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71. В таких клетках хелатор железа повышал экспрессию CD105 на  $50 \pm 5\%$ , в клетках меланомы с низкой экспрессией CD71 хелатор железа повышал в 8 раз число клеток, экспрессирующих CD105. Донор железа также повышал экспрессию CD105 на  $35 \pm 4\%$  в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71. В клетках меланомы с низкой экспрессией CD71 донор железа снижал экспрессию CD105 на  $300 \pm 3\%$ .

**Заключение.** Активация аутофагии способствует выживанию опухолевых клеток при генотоксическом стрессе, запуская ряд метаболически важных функций клетки с участием железа.

**Ключевые слова:** аутофагия, железо, меланома, CD71, CD105

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-29-35

### CROSSTALK BETWEEN AUTOPHAGY AND IRON IN MELANOMA PROGRESSION

A.A. Vartanian, O.S. Burova, Yu.A. Khochenkova, M.A. Baryshnikova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;

24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** Autophagy, a catabolic process of protein and organelle recycling by transferring defective cytoplasm and organelles into double-membraned vesicles to degrade and regenerate materials, plays a critical role in maintaining energy homeostasis. Inefficiency chemo- and radiotherapy is largely associated with the activation of autophagy. Among the metals needed by the living organism, iron occupies a special place. The rapid growth of malignant tumors requires much more iron than the metabolism of normal cells.

**Objective.** To elucidate the relationship between autophagy and iron in melanoma progression.

**Materials and methods.** In this study we used 2D- and 3D-culturing of melanoma cells with high expression of CD71 (mel P and mel Z) and low expression of CD71 (mel Gus and mel Ibr), flow cytometry and fluorescence microscopy.

**Results.** The uptake of iron in cancer cells occurs through translocation of the complex of transferrin/receptor (CD71) in the cytoplasm with subsequent dissociation of iron from the complex. Chelation of iron by deferoxamine in melanoma cells mel P and mel Z reduced the level of autophagy about 2-fold. In the presence of an iron donor ferrum ammonium citrate the level of autophagy increased 2.5-fold. The same correlation was observed in melanoma cells with low expression of CD71. Chelation of iron in melanoma cells with high CD71 expression blocked the formation of capillary-like structures. In the presence of an iron donor the formation of capillary-like structures was also not observed. The same correlation was observed in melanoma cells with low expression of CD71. There was an increase in CD105 expression about  $50 \pm 5\%$  and  $800 \pm 50\%$  under the condition of iron chelation in melanoma cells with high and low expression of CD71, respectively. Quite unexpectedly, iron donor also increased expression of CD105 about  $35 \pm 4\%$  and  $300 \pm 3\%$  in melanoma cells with high and low expression of CD71, respectively.

**Conclusions.** *The activation of autophagy promotes the survival of tumor cells by triggering a number of metabolic functions with the participation of iron.*

**Key words:** *autophagy, iron, melanoma, CD71, CD105*

### Введение

Аутофагия — древнейший механизм регуляции клеточного гомеостаза. Посредством аутофагии клетка избавляется от поврежденных органелл и долгоживущих белков, регулируя состав цитозоля и размеры эндоплазматической сети. Благодаря аутофагии становятся возможны расщепление собственных макромолекул и повторное их использование для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки [1]. Непрерывно работающая система аутофагии поддерживает также концентрацию токсичных метаболитов клетки на безопасном уровне [2]. Аутофагия — процесс избирательный и строго регулируемый. Нарушенная регуляция или сниженная активность аутофагии приводят к неизбежным ошибкам, последствиями которых могут быть самые разнообразные патологии — от злокачественных заболеваний до нейродегенеративных расстройств [3]. При злокачественных заболеваниях на ранних стадиях опухолевой трансформации клетки активация аутофагии проявляет противоопухолевый эффект, способствуя развитию защитного механизма. На поздних стадиях заболевания, при гипоксии, лучевой терапии или действии цитотоксических противоопухолевых препаратов аутофагия используется опухолевой клеткой как механизм выживания и может стать причиной лекарственной устойчивости и быстрой прогрессии опухоли [4]. Результаты, полученные в нашей лаборатории, позволили идентифицировать ранее не описанную в литературе функцию аутофагии — участие в сигнальных путях, вовлекающихся в формирование сети васкулярных каналов опухолевыми клетками, васкулогенной мимикрии (ВМ), которая может частично компенсировать недостаточно быстрое развитие в опухоли кровеносной микроциркуляторной сети [5–7].

Стремительный рост злокачественной опухоли требует значительно большего расхода железа, нежели метаболизм нормальных клеток. У онкологических больных дефицит железа обнаруживается постоянно. Опухолевые клетки активно «изымают» из крови трансферрин (Тf), переносчик железа [8]. CD71 — рецептор трансферрина, практически единственный белок, участвующий в транспорте железа в клетку. Взаимодействие комплекса железо–трансферрин с рецептором приводит к интернализации комплекса CD71/Tf/Fe<sup>3+</sup> в клетку. В клетке железо диссоциирует из комплекса, а рецептор и трансферрин независимо возвращаются на поверхность клетки. Захват

железа тем значительнее, чем больше масса самой опухоли и чем более она злокачественна. Одной из причин такого активного поглощения железа опухолевыми клетками может стать необходимость этого металла как кофактора рибонуклеотид редуктазы, фермента, конвертирующего рибонуклеотид трифосфаты в дезоксирибонуклеотид трифосфаты, необходимые для биосинтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [9]. Железо является также активной частью дыхательных ферментов (при его недостатке ткани не могут усваивать кислород [10]) и участвует в генерации аденозинтрифосфата — источника биологической энергии в живых организмах [11]. Реалистичным выглядит сценарий, согласно которому одной из основных причин смертности от рака являются расстройства, вызванные нарушением обмена железа в организме [12].

**Целью** нашей работы стало получение экспериментального подтверждения существования взаимосвязи между аутофагией и железом при меланоме.

### Материалы

Цитрат железа (II) аммония (FAC) (#F5879), дефероксамин мезилат (DFO) (#D9533) и монодансилкадаверин (monodansylcadaverine, MDC #D4008) были приобретены у Sigma-Aldrich Corporation (США). Антитела к CD105 FITC- или PE-конъюгированные были получены от Miltenui Biotec (Германия) и антитела к CD71 FITC-конъюгированные были получены от NOVUS Biological, LLC (США).

### Методы

#### Культура клеток

В работе использованы клеточные линии меланомы mel Z, mel P, mel Gus и mel Ibr, выведенные из опухолевого материала пациентов, находившихся на лечении в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [13]. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 ммоль/мл глутамина и 0,1 мг/мл гентамицина. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 2–3 дня. Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ. В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюентности.

#### 3D-культура

На дно 24-луночного планшета на льду быстро наносили 100 мкл матригеля (8,7 мг/мл), планшет

оставляли при комнатной температуре на 1 ч и затем помещали в  $\text{CO}_2$  инкубатор на 30 мин. Клетки с нецитотоксическими концентрациями донора или хелатора железа добавляли в количестве  $2 \times 10^5$  в полной среде RPMI-1640 на гелевую матрицу и продолжали инкубировать при  $37^\circ\text{C}$  в  $\text{CO}_2$  инкубаторе. Формирование сосудистоподобных структур (СПС) наблюдалось через 14–16 ч роста клеток на матрицеле.

### **Окрашивание клеток MDC**

Клетки меланомы в течение ночи инкубировали с донором (FAC) или хелатором железа (DFO). Утром среду замещали свежей и добавляли 0,05 ммоль MDC в RPMI-1640 без сыворотки, инкубировали 20–30 мин при  $37^\circ\text{C}$  в  $\text{CO}_2$  инкубаторе. Далее клетки 3 раза промывали ледяным натрий-фосфатным буфером и немедленно определяли флуоресценцию на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США).

### **Определение экспрессии CD105 и CD71**

Фенотипирование антигенов клеточной поверхности проводили в реакции прямой иммунофлуоресценции.  $1 \times 10^5$  клеток трижды промывали PBS pH = 7,5 и ресуспендировали в PBS. В каждую пробирку с клетками добавляли моноклональные антитела, меченные FITC или PE, и инкубировали в течение 30 мин при  $+4^\circ\text{C}$ . Клетки дважды промывали PBS от несвязавшихся антител и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащем 1 % формалин. Экспрессию антигенов CD105 и CD71 на клеточной поверхности оценивали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (Becton Dickinson, США). В каждой пробе анализировали до 10 тыс. событий. Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеивания и размера клеток.

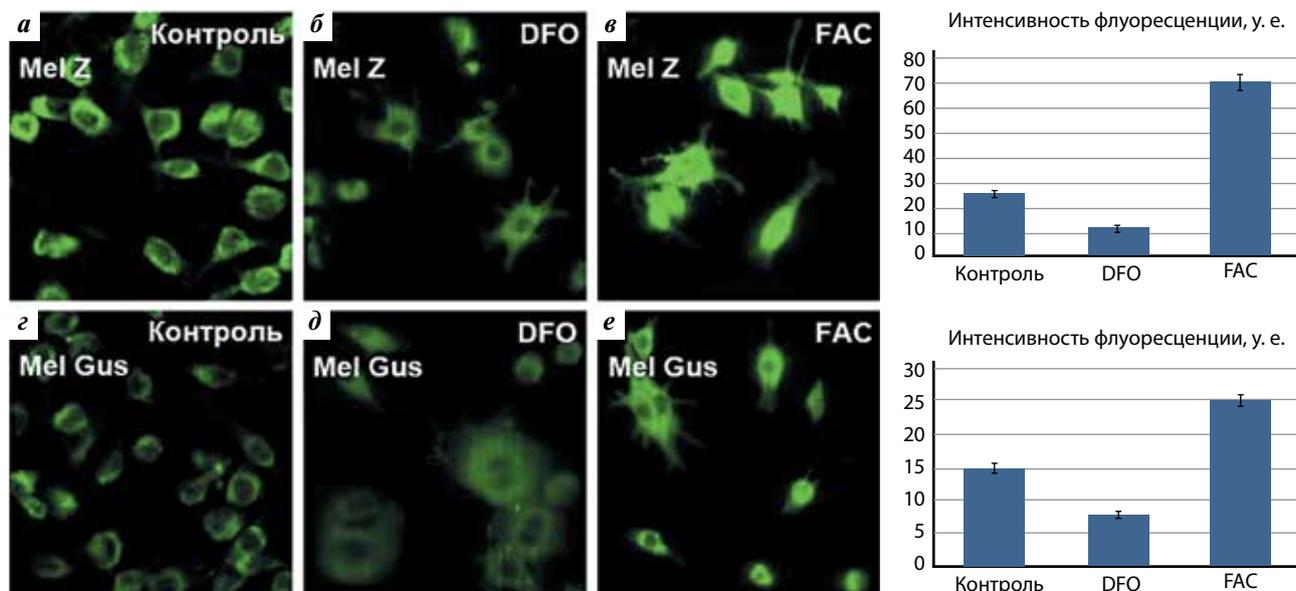
### **Результаты и обсуждение**

В работе были использованы клеточные линии меланомы кожи mel P и mel Z с высокой экспрессией CD71, а также mel Ibr и mel Gus с низкой экспрессией CD71.

Об уровне аутофагии в клетках меланомы судили по изменениям, происходящим в необратимой стадии аутофагии. Активация аутофагии сопровождается протеолитическим расщеплением белка LC-3 (Atg8) в изоформу LC-3A. Его конъюгация с фосфатидилэтаноламином приводит к образованию LC-3B формы, которая и встраивается в мембрану аутофагосомы. В процессе сборки аутофагосомы участвует только LC-3B изоформа белка. Недавно был предложен другой метод для мониторинга аутофагии – окрашивание аутофагосом флуоресцентным красителем монодансилкадаверином (MDC). Избирательное аккумулялирование MDC в аутофагосомах посредст-

вом специфического взаимодействия с липидами мембран аутофагосом свидетельствует о переходе аутофагии в необратимую фазу. Ранее нами было показано, что экспрессия LC-3B в клетках меланомы, определенная методом иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре, строго коррелирует с флуоресценцией MDC [5]. И потому в этом исследовании за базовым уровнем аутофагии мы следили по флуоресценции MDC. В предварительных исследованиях были подобраны концентрации донора железа, FAC и хелатора железа, DFO, не индуцирующие гибель клеток. На рис. 1 представлены результаты, свидетельствующие о влиянии нецитотоксических концентраций донора железа (100 мкг/мл) и хелатора железа (100 мкМ) на базовый уровень аутофагии в клетках меланомы, использованных в данном исследовании. Базовый уровень аутофагии в клеточных линиях mel P и mel Z с высокой экспрессией CD71 ( $50 \pm 3$  и  $64 \pm 3$  % соответственно) был значительно выше, чем в клеточных линиях mel Gus и mel Ibr с низкой экспрессией CD71 ( $2,8 \pm 0,05$  и  $5,3 \pm 1$  % соответственно). Поскольку высокозлокачественный фенотип коррелирует с высоким уровнем аутофагии в клетках меланомы [5], полученные нами результаты позволяют предположить, что ионы железа вовлекаются в процессы, поддерживающие агрессивность клеток меланомы. Подтвердить это нам удалось исследованием вклада донора и хелатора железа в базовый уровень аутофагии. Донор железа в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71 mel P и mel Z повышал базовый уровень аутофагии в 2,5 раза, а хелатор железа понижал его в 2 раза (рис. 1а–в). Аналогичная закономерность наблюдалась и на 2 других клеточных линиях меланомы Mel Gus и Mel Ibr с низкой экспрессией CD71 (рис. 1г–е). Полученные нами данные о снижении базового уровня аутофагии хелатором железа в клетках меланомы как с высокой, так и с низкой экспрессией CD71 указывают на то, что железо является необходимым компонентом поддержания высокоагрессивного фенотипа клеток меланомы. Подтверждением нашей гипотезы послужили опубликованные недавно данные о том, что в экспериментальной модели рака легкого на C57/Black-мышьях рост опухоли заметно снижался в ответ на бевацизумаб у мышей с низким содержанием сывороточного железа [14]. Низкий уровень железа в крови C57/Black-мышьях поддерживали желездефицитной диетой.

По данным иммуногистохимического анализа, низкая экспрессия CD71 на опухолевых клетках коррелирует с меньшей частотой выявления метастазов и более высокой общей и безрецидивной выживаемостью больных [15]. Для выяснения роли железа в прогрессии меланомы, в частности при переходе опухоли в фазу более агрессивного роста,

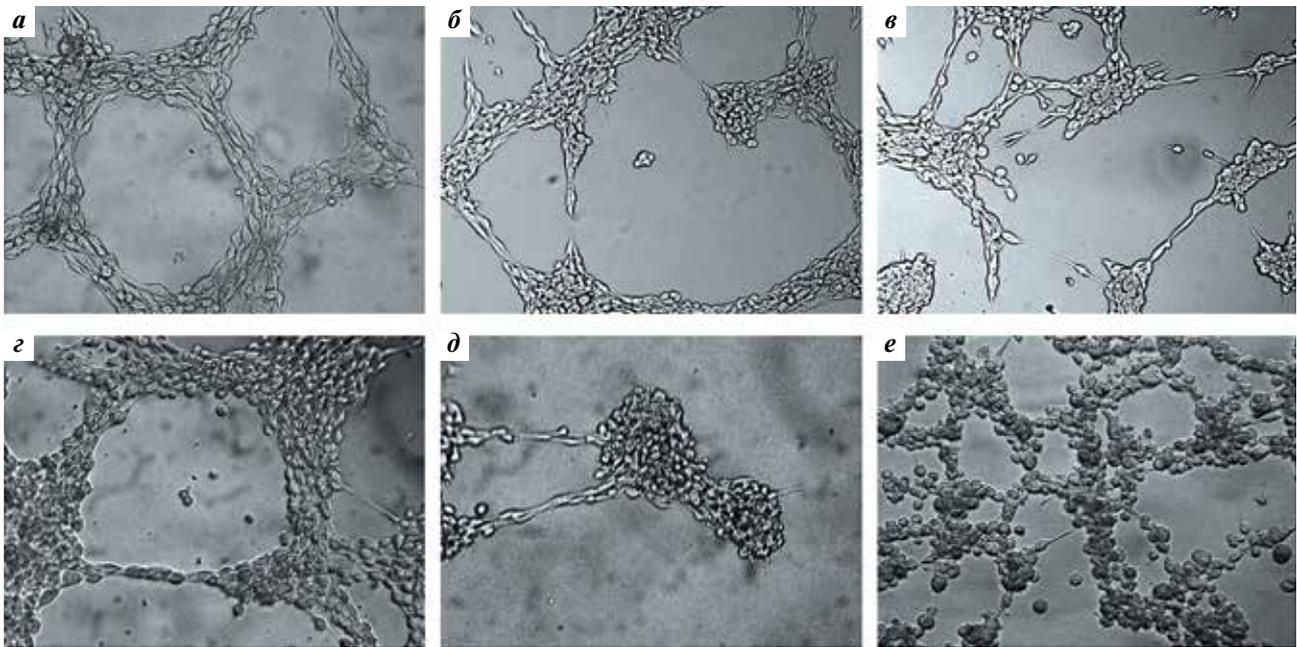


**Рис. 1.** Влияние хелатора железа, DFO, 100 мкМ (а, б, д), и донора железа FAC, 100 мкг/мл (в, е), на базовый уровень аутофагии в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71 – mel Z и с низкой экспрессией CD71 – mel Gus. Контроль – а, з. Базовый уровень аутофагии определяли интенсивностью флуоресценции красителя MDC  $\times$  20. Представленные данные отражают результаты 3 независимых экспериментов

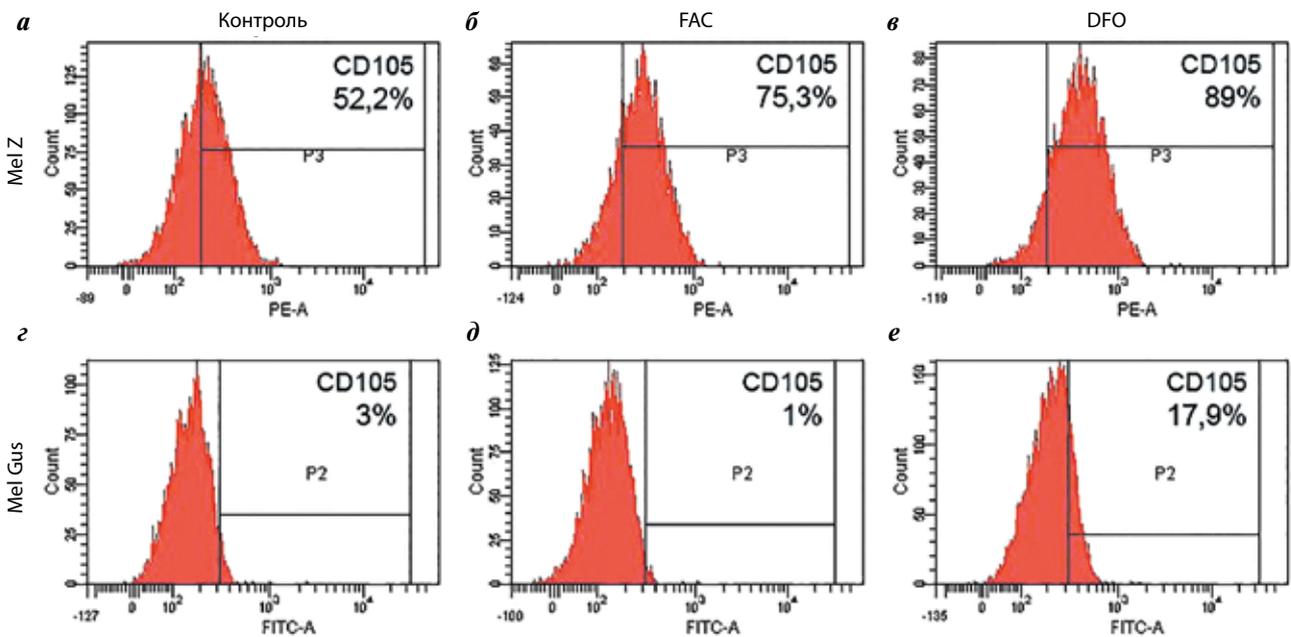
нами была использована способность клеток меланомы формировать васкулярную сеть в опухоли. На сегодняшний день получены убедительные доказательства, подтверждающие, что васкулярные каналы формируют опухолевые клетки с высоко злокачественным фенотипом, слабоагрессивные опухолевые клетки таких структур не образуют [16]. В качестве *in vitro* теста ВМ используется формирование СПС в 3D-культуре, на гелевой матрице. Поведение клеток меланомы с высокой экспрессией CD71 и низкой экспрессией CD71 в 3D-культуре заметно отличалось. Mel P- и mel Z-клетки формировали СПС к 5–6 ч роста на матрикеле, и эти структуры были стабильны в течение 20–24 ч. Mel Gus и mel Ibr формировали СПС к 3–4 ч роста на матрикеле, к 6–7 ч роста клеток на матрикеле наблюдался спонтанный распад СПС. По всей видимости, концентрация железа в среде (3 мкМ) при культивировании клеток полностью покрывает необходимость этого металла для пролиферации опухолевых клеток с низкой экспрессией CD71, но не обеспечивает достаточного поступления железа в клетку, необходимого для поддержания стабильности СПС. Донор железа изменял геометрию СПС, сформированных клетками меланомы с высокой экспрессией CD71 mel Z (рис. 2а, б). Когда mel Z росли в присутствии хелатора железа, клетки ненормально вытягивались, формирование СПС в 3D-культуре не наблюдалось (рис. 2в). Представленные результаты были воспроизведены на другой клеточной линии меланомы, активно экспрессирующей CD71, – mel P (данные не приводятся) и подтвердили выявленную закономерность: хелатор же-

леза и в несколько меньшей степени донор железа блокируют формирование СПС. Клетки меланомы с низкой экспрессией CD71 mel Gus и mel Ibr в присутствии хелатора железа полностью теряли способность к коммуникации, необходимую для формирования СПС. Донор железа не восстанавливал способность этих клеток формировать СПС (рис. 2з–е). Формирование СПС в 3D-культуре происходит путем последовательных событий. Клетки останавливают пролиферацию, мигрируют, узнают друг друга, формируя контакты посредством VE-кадгерина, удлиняются, прикрепляются к внеклеточному матриксу и формируют СПС. Нами и другими исследователями было показано, что становление ВМ зависит от  $Ca^{2+}$ -чувствительной перестройки актинового цитоскелета, включая как изменение формы клетки, так и создание адгезивных сайтов, необходимых для подвижности клетки, ее удлинения и формирования контактов между клеткой и внеклеточным матриксом [16, 17]. По всей видимости, дефицит железа отражается на доступности  $Ca^{2+}$ , необходимой для реорганизации актина и формирования васкулярной сети опухолевыми клетками. Полученные нами данные о блокировании формирования СПС хелатированием железа открывают новые возможности ингибирования кровоснабжения опухоли.

Было также изучено влияние железа на экспрессию эндоглина (CD105). CD105 является белком-рецептором суперсемейства TGF- $\beta$ , регулирующим процессы ангиогенеза, независимые от VEGF. CD105 с высокой плотностью экспрессирован на эндотелии сосудов растущих опухолей и служит ключевым



**Рис. 2.** Влияние донора железа FAC, 100 мкг/мл (а, б), и хелатора железа DFO, 100 мкМ (а, в), на формирование сосудистоподобных структур на матрицеле клетками меланомы mel Z и mel Gus (г, д) и (г, е), ×20



**Рис. 3.** Влияние донора железа FAC, 100 мкг/мл (а, б и г, д), и хелатора железа DFO, 100 мкМ (а, в и г, е), на уровень экспрессии CD105 в клетках меланомы mel Z и mel Gus. Экспрессию CD105 определяли проточной цитофлуориметрией с использованием антител к CD105. В каждой пробе анализировали до 10 тыс. событий. Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеивания и размера клеток. Представленные данные отражают результаты 3 независимых экспериментов

элементом механизмов, определяющих состояния покоя или активации клеток эндотелия [18]. Наряду с эндотелием CD105 присутствует на мембранах клеток стромы опухолей и самих опухолевых клеток [19]. Было показано, что высокая экспрессия CD105 на клетках меланомы коррелирует с агрессивностью новообразований и неблагоприятным прогнозом [20].

Экспрессия CD105 была значительно выше в клетках меланомы с высокой экспрессией CD71, чем в клетках с низкой экспрессией CD71. В этих клетках хелатор железа повышал экспрессию CD105 на  $50 \pm 4\%$  (рис. 3а, б). В клетках меланомы с низкой экспрессией CD71 хелатор железа активировал экспрессию CD105, в 8 раз увеличивалось число клеток

с экспрессией CD105. Следует отметить, что высокая экспрессия CD105 характерна для клеток меланомы, метастазирующих в мозг [20]. Несколько неожиданным оказалось поведение клеток меланомы в присутствии донора железа. Донор железа в клетках меланомы с низкой экспрессией CD71 снижал экспрессию CD105 на  $300 \pm 20 \%$ , в клетках же меланомы с высокой экспрессией CD71 наблюдалось повышение экспрессии CD105 на  $60 \pm 2 \%$ . Мы предполагаем, что дефицит железа в клетках меланомы активирует ряд сигнальных путей, под контролем которых находится экспрессия CD105.

### Заключение

В последние годы с развитием молекулярно-биологических технологий понимание метаболизма железа значительно расширилось. Выяснилось, что опухолевые клетки репрограммируют метаболизм железа, активируя экспрессию рецептора трансферрина (CD71) и подавляя экспрессию ферритина, депонирующего железо в клетке. С другой стороны, одной из составляющих лекарственной резистентности является активация аутофагии. Для выяснения взаимосвязи между аутофагией и железом в прогрес-

сии меланомы мы использовали 2 типа клеток меланомы — с высокой и низкой экспрессией CD71. Мы показали:

- что высокая экспрессия CD71 коррелирует с высоким базовым уровнем аутофагии;
- хелатирование железа изменяет цитоскелет клетки;
- дефицит железа в клетках меланомы сопровождается повышением экспрессии CD105.

Полученные нами результаты согласуются с результатами ранее опубликованных работ о роли железа в метаболизме опухолевых клеток. Было показано, что использование терапевтических антител к CD71 или конъюгатов трансферрина, которые связывались с CD71 и интернализировались в клетку, способствовало повышению эффективности цитотоксической химиотерапии [21]. Другим подтверждением полученных нами результатов являются данные о том, что захват железа посредством комплекса CD71/трансферрин был заметно повышен у стволовых клеток глиобластомы по сравнению с нестволовыми клетками [22]. Все это подводит нас к идее, что железо, по всей видимости, может стать еще одной мишенью для терапии злокачественных заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mizushima N., Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011;147(4):728–41. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026. PMID: 22078875.
2. Rabinowitz J.D., White E. Autophagy and metabolism. *Science* 2010;330(6009):1344–8. DOI: 10.1126/science.1193497. PMID: 21127245.
3. Menzies F.M., Fleming A., Rubinsztein D.C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2015;16(6):345–57. DOI: 10.1038/nrn3961. PMID: 25991442.
4. Sun K., Deng W., Zhang S. et al. Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells. *Cell Biosci* 2013;3(1):35–42. DOI: 10.1186/2045-3701-3-35. PMID: 24016776.
5. Вартамян А.А., Бурова О.С., Уласов И.В., Барышникова М.А. Вовлечение аутофагии в васкулогенную мимикрию при меланоме. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(2):66–73. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-66-73. [Vartanian A.A., Burova O.S., Ulasov I.S., Baryshnikova M.A. The involvement of autophagy in melanoma vasculogenic mimicry. *Rossiysky Bioterpevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(2):66–73. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-66-73. (In Russ.)].
6. Вартамян А.А., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Блокатор васкулогенной мимикрии восстанавливает чувствительность резистентных клеток меланомы к ДНК-повреждающим агентам // *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):19–20. [Vartanian A.A., Baryshnikova M.A., Burova O.S. et al. Inhibitor of vasculogenic mimicry recovers the sensitivity of drug-resistant melanoma cells to DNA-damaging agents. *Rossiysky Bioterpevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):19–20. (In Russ.)].
7. Вартамян А.А., Хоченков Д.А., Бурова О.С. Взаимосвязь между аутофагией и железом в васкулогенной мимикрии // *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(спецвыпуск):15. [Vartanian A.A., Khochenkov D.A., Burova O.S. Interaction between autophagy and iron in vasculogenic mimicry *Rossiysky Bioterpevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(Special Issue):15. (In Russ.)].
8. Reichert C.O., da Cunha J., Levy D. et al. Hepcidin: Homeostasis and Diseases Related to Iron Metabolism. *Acta Haematol* 2017;137(4):220–36. DOI: 10.1159/000471838. PMID: 28514781.
9. Zhang D.L., Ghosh M.C., Rouault T.A. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis — an update. *Front Pharmacol* 2014;5:124–9. PMID: 24982634.
10. Munoz M., Villar I., Garcia-Erce J.A. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 2009;15:4617–4626. PMID: 19787824.
11. Kleingardner J.G., Bren K.L. Biological significance and applications of heme proteins and peptides. *Acc Chem Res* 2015;48(7):1845–52. DOI: 10.1021/acc.accounts.5b00106. PMID: 26083801.
12. Вартамян А.А. Метаболизм железа, ферроптоз, рак // *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):14–20. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20 [Vartanian A.A. Iron metabolism, ferroptosis and cancer. *Rossiysky Bioterpevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(3):14–20.

- DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20. (In Russ.).
13. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы как основа для создания противоопухолевых вакцин. Вестник Российской академии медицинских наук 2005;7:37–40. [Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Baryshnikov A.Yu. et al. Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation. Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskih Nauk = Bulletin of Russian Academy of Medical Sciences 2005;7:37–40. (In Russ.)]. 2005;7:37–40.
14. Khirova N., Turner A.M. The role of iron in pulmonary pathology. Multidiscip Respir Med 2015;10:34. DOI: 10.1186/s40248-015-0031-2. PMID: 26629341.
15. Calzolari A., Oliviero I., Deaglio S. et al. Transferrin receptor is frequently expressed in human cancer. Blood Cells Mol Dis 2007;39(1):82–91. PMID: 17428703.
16. Hendrix M.J., Sefter E.A., Sefter R.E. et al. Tumor vasculogenic mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. Pharmacol Ther 2016;159:83–92. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.006. PMID: 26808163.
17. Vartanian A., Stepanova E., Grigorieva I. et al. Melanoma Vasculogenic Mimicry Capillary-Like Structure Formation Depends on Integrin and Calcium Signaling. Microcirculation 2011;18(5):390–9. DOI: 10.1111/j.1549-8719.2011.00102.
18. Dallas N.A., Samuel S., Xia L. et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. Clin Cancer Res 2008;14(7):1931–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4478. PMID: 18381930.
19. Altomonte M., Montagner R., Fonsatti E. et al. Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. Br J Cancer 1996;74(10):1586–91. PMID: 8932339.
20. Salgado K.B., Toscani N.V., Silva L.L. et al. Immunoexpression of endoglin in brain metastasis secondary to malignant melanoma Clin Exp Metastasis 2007;24(6):403–10. DOI: 10.1007/s10585-007-9077-7. PMID: 17564791.
21. Daniels-Wells T.R., Penichet M.L. Transferrin receptor 1: a target for antibody-mediated cancer therapy. Immunotherapy 2016;8(9):991–4. DOI: 10.2217/imt-20160-0050. PMID: 27373880.
22. Schonberg D.L., Miller T.E., Wu Q. et al. Preferential Iron Trafficking Characterizes Glioblastoma Stem-like Cells. Cancer Cell 2015;28:441–55. PMID: 26461092.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

А.А. Вартанян / A.A. Vartanyan: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>

О.С. Бурова / O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>

М.А. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# ИММУНИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ PRAME ЗАМЕДЛЯЕТ РОСТ PRAME-ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛИ У МЫШЕЙ

Ю. П. Финашутина<sup>1</sup>, Н. А. Лыжко<sup>1</sup>, Н. Н. Касаткина<sup>1</sup>, Л. А. Кесаева<sup>1</sup>, В. В. Тихонова<sup>1</sup>,  
В. А. Мисюрин<sup>1</sup>, М. А. Барышникова<sup>1</sup>, А. В. Мисюрин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

<sup>2</sup>ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

Контакты: Юлия Павловна Финашутина j\_finashutina@mail.ru

**Введение.** Белок PRAME, экспрессирующийся во многих опухолях и практически отсутствующий в нормальных тканях, может быть подходящей мишенью для иммунотерапии рака, так как способен вызывать иммунный ответ.

**Цель исследования** — изучение противоопухолевого эффекта профилактической иммунизации рекомбинантным человеческим белком PRAME на иммунокомпетентных мышах.

**Материалы и методы.** В работе были использованы культура клеток меланомы мыши B16F10, мыши линии C57BL/6, клонирование, трансфекция, полимеразная цепная реакция в реальном времени, анализ вестерн-блот, проточная цитофлуориметрия и иммуноферментный анализ.

**Результаты.** Были получены клетки меланомы мыши, трансфицированные плазмидой с вставкой гена PRAME человека и экспрессирующие соответствующий белок на высоком уровне. После нескольких предварительных иммунизаций композицией, содержащей рекомбинантный белок PRAME и адьювант, у мышей значительно замедлялся рост меланомы B16F10, экспрессирующей человеческий антиген PRAME (торможение роста опухоли — 98,41%), и у животных данной группы детектировался высокий титр ( $6,14 \times 10^5$ ) специфических антител в сыворотке.

**Заключение.** Полученные данные позволяют предположить, что рекомбинантный белок PRAME можно рассматривать как перспективный антиген для противоопухолевой иммунотерапии.

**Ключевые слова:** рекомбинантный антиген, PRAME, иммунизация, трансфекция, меланома мыши B16F10

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-36-42

## RECOMBINANT HUMAN PRAME IMMUNIZATION REDUCES PRAME-EXPRESSING TUMOR GROWTH IN MICE

Yu. P. Finashutina<sup>1</sup>, N. A. Lyzhko<sup>1</sup>, N. N. Kasatkina<sup>1</sup>, L. A. Kesaeva<sup>1</sup>, V. V. Tikhonova<sup>1</sup>,  
V. A. Misyurin<sup>1</sup>, M. A. Baryshnikova<sup>1</sup>, A. V. Misyurin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>GeneTechnology LLC; 104 Profsoyuznaya St., Moscow 117485, Russia

**Introduction.** Human antigen PRAME is preferentially expressed in a number of different tumor types and may be a potent target for anti-tumor immunotherapy.

**Purpose.** To study anti-tumor action of immunogenic mix recombinant PRAME protein and adjuvant in mice with innate immunity.

**Materials and methods.** C57BL/6 female mice were used for immunization with purified human recombinant protein PRAME. Human PRAME gene coding sequence was cloned in mammalian expressing vector pCEP4 and resulting plasmid was introduced in mouse melanoma B16F10 cells by transfection followed by RQ-PCR, Western blot and flow-cytometry analysis. Then stably PRAME-transfected melanoma cells were injected in mice.

**Results.** The mouse melanoma B16F10 cells stably expressing human PRAME protein were obtained. We demonstrate the 10-fold decreased tumor volume in mice with melanoma B16F10 expressing human PRAME after preventive immunization series with recombinant PRAME protein. The tumor volume reducing was correlated with high titer ( $6.14 \times 10^5$ ) of anti-PRAME antibodies in mice sera.

**Conclusion.** These data indicate that recombinant protein PRAME is immunogenic and may be a potent antigen for immunotherapy studies.

**Key words:** recombinant antigen, PRAME, immunization, mouse B16F10 melanoma

### Введение

В настоящее время традиционные методы лечения рака увеличивают выживаемость пациентов, но они часто ассоциированы с побочными эффектами и далеко не всегда позволяют достичь полной ремиссии. Кроме того, часть пациентов с опухолями оказываются резистентными к стандартной противоопухолевой терапии. Проблема ранних рецидивов также остается значимой. Ряд опухолей, такие как меланома и гепатоцеллюлярная карцинома, обладают незначительной чувствительностью к противоопухолевой терапии. Таким образом, существует необходимость в разработке новых методов лечения рака, более специфичных и менее токсичных.

Исследования последних десятилетий в области иммунологии, а также понимание клеточных и молекулярных путей при канцерогенезе привели к разработке различных иммунотерапевтических подходов для лечения опухолей [1].

В связи с открытием различных опухолевых антигенов, способных вызывать специфический иммунный ответ, иммунотерапевтические методы лечения включают также противоопухолевую вакцинацию [2]. Потенциальными преимуществами иммунотерапии являются специфичность против опухолевых клеток, сниженный риск повреждения нормальных тканей и вероятный пролонгированный эффект. Ограничением такого вида терапии может быть слабый иммунный ответ против антигенов опухоли. Соответственно, для усиления противоопухолевого иммунного ответа необходимо применять также иммуностимулирующие вещества и тщательно подойти к выбору мишени для иммунотерапии.

Антиген *PRAME* может быть перспективной мишенью для иммунотерапии, так как экспрессируется в различных опухолях, например, при меланоме, немелкоклеточном раке легкого и гемобластозах [3, 4] и практически не экспрессируется в нормальных тканях. Белки с такими характеристиками относят к группе раково-тестикулярных антигенов [5]. Ряд исследований подтверждает его иммуногенность и способность индуцировать цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ [6–8].

Таким образом, разработка новых подходов для оценки иммунотерапевтического потенциала белка *PRAME* является перспективной. Исследование противоопухолевых вакцин на животных моделях опухолей, экспрессирующих человеческие опухолевые антигены, часто используется в рамках предварительных доклинических исследований [9, 10]. Кроме того, используются модели опухолей с иммунизацией собственными мышинными опухолевыми антигенами [11].

В данной работе оценивается эффект иммунизации рекомбинантным белком *PRAME* на модели *PRAME*-экспрессирующей опухоли у мышей.

### Материалы и методы

#### Бактериальные штаммы и клеточные линии

Использовались штаммы *E. coli* DH-5 $\alpha$ , линия эритромиелоидного лейкоза K562, линия меланомы мыши B16F10.

#### Получение рекомбинантного белка *PRAME*

Рекомбинантный человеческий белок *PRAME* очищали хроматографически из клеток штамма-продуцента *E. coli* [12] и стерилизовали фильтрацией. Концентрацию белка измеряли методом Брэдфорд. Очищенный белок сорбировали на суспензии гидроксида алюминия (Brenntag Biosector) в течение 24 ч перед инъекцией.

#### Получение экспрессионного вектора

Кодирующую последовательность гена *PRAME* получали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами *prmF* и *prmR* (табл. 1) с комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), выделенной из линии клеток K562. ПЦР-фрагмент был клонирован в промежуточную плазмиду pGEM-T Easy, а затем переклонирован в плазмиду pCEP4 (Invitrogen) по сайтам рестрикции NotI. Плазмидную ДНК для последующей трансфекции выделяли набором Wizard<sup>®</sup> MagneSil (Promega).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в данной работе

| Название                       | 5'–3' - последовательность |
|--------------------------------|----------------------------|
| <i>prmF</i>                    | ATGGAACGAAGCGTTTGTGG       |
| <i>prmR</i>                    | GCACCCAGCTAGTTAGGCATGAAA   |
| <i>mactF</i> ( $\beta$ -актин) | AAGTGTGACGTTGACATCCGTA     |
| <i>mactR</i> ( $\beta$ -актин) | TGCCTGGGTACATGGTGGTA       |
| <i>prmFb</i>                   | GACTCTTATTTTTTCCCTAGA      |
| <i>prmRb</i>                   | CGAAAGCCGGCAGTTAGTTATT     |

#### Трансфекция клеток меланомы

Клетки меланомы мыши B16F10 выращивали в среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамин, 10 мМ HEPES, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки при 5 % CO<sub>2</sub>. Трансфекцию проводили с помощью набора TransFast (Promega) по инструкции производителя; для 5 × 10<sup>4</sup> клеток брали 500 нг очищенной от эндотоксинов плазмидной ДНК pCEP4-*PRAME*. Методом лимитирующих разведений на селективной среде при концентрации гидромицина 50 мкг/мл отбирались клетки с максимальной и стабильной экспрессией гена *PRAME*.

#### Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Экспрессию гена *PRAME* определяли методом ПЦР в реальном времени. Комплементарную ДНК

гена *PRAME* и референсного гена (*бета-актин*) амплифицировали при помощи специфических праймеров *prnFb* и *prnRb* (см. табл. 1) в присутствии красителя SYBR Green. Реакция проводилась на оборудовании Roche LightCycler® 96 System. Для оценки уровня экспрессии вычисляли соотношение относительных количеств копий комплементарной ДНК гена и референсного гена, данные значения определяли при помощи построения стандартных кривых.

#### **Иммуноблоттинг**

Экспрессию белка определяли в лизатах клеток V16F10, трансфицированных плазмидой с геном *PRAME*. Лизаты приготавливали при помощи RIPA-буфера с ингибиторами протеаз (Thermo Scientific Pierce, США). Электрофорез в 10 % полиакриламидном геле проводили по стандартной методике Laemmli [13], на 1 дорожку наносили 50 мкг тотального белка. После электрофореза перенос белков из геля на Amersham Hybond-P PVDF мембрану (GE Healthcare, Великобритания) осуществляли методом полусухого электроблоттинга. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к белку *PRAME*, полученные нами ранее [12]; вторичных – антитела козы против антител мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Dako Research, США). Для визуализации белка, связавшегося с антителами, использовали двухкомпонентную систему Clarity Western ECL (Bio-Rad).

#### **Проточная цитометрия**

Эффективность трансфекции клеток V16F10 оценивали на проточном цитометре ACEA NovoCyte (ACEA Biosciences, США). Перед окрашиванием белка *PRAME* проводилась пермеабилзация клеток реактивами Fixation Buffer и Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (SONY biotechnology, Япония) согласно протоколу, предложенному производителем. Для окрашивания клеток использовались моноклональные антитела к белку *PRAME* [12] и вторичные FITC-меченные антимишские антитела (Vecton Dickinson, США). В качестве контроля использовались V16F10, трансфицированные пустым вектором.

#### **Иммунизация животных рекомбинантным белком**

Для трансплантации опухолевых клеток использовали иммунокомпетентных мышей-самок линии C57BL/6J массой тела не менее 18 г из питомника ООО «Столбовая, питомник лабораторных животных». Группы по 5 мышей были четырежды иммунизированы внутрибрюшинно с двухнедельными интервалами рекомбинантным белком *PRAME* в дозе 50 мкг на мышью с 300 мкг гидроксида алюминия в качестве адъюванта. Титр антител в сыворотке кро-

ви оценивался методом твердофазного иммуноферментного анализа перед введением животным клеток опухоли, а также на 14-й и 21-й день после трансплантации опухолевых клеток.

#### **Измерение опухолей**

Клетки опухоли V16F10-*PRAME* были подкожно трансплантированы в дозе  $2 \times 10^5$  клеток на мышью через 14 дней после последней иммунизации. Размеры опухолей измерялись на 14, 18 и 21-й дни после введения клеток. Пальпируемые узлы измеряли и рассчитывали объем по формуле  $V = 0,5 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$ , торможение роста опухоли (ТРО) – по формуле  $\text{ТРО} = (V_{\text{к}} - V_{\text{о}}) / V_{\text{к}} \times 100 \%$  [14], где  $V_{\text{к}}$  – средний объем опухоли у животных контрольной группы, получавших инъекции адъюванта;  $V_{\text{о}}$  – средний объем опухоли у животных контрольной группы, получавших инъекции рекомбинантного белка с адъювантом либо без адъюванта. При статистической обработке применяли метод Манна–Уитни.

#### **Иммуноферментный анализ**

В лунку планшета наносили рекомбинантный белок *PRAME* в концентрации 2 мкг/мл. Затем после отмывания вносили образцы сывороток крови мышей в двукратных разведениях. В качестве вторичных антител использовали конъюгат антител козы с пероксидазой хрена против IgG мыши (Dako Research, США). Проявляли реакцию раствором тетраметилбензидина и после остановки реакции измеряли оптическую плотность (ОП) при 450 нм. Титром сыворотки считали ее разведение, при котором значения ОП вдвое превышали контрольные значения.

#### **Результаты и обсуждение**

##### **Получение клеток мышинной меланомы, экспрессирующих белок *PRAME* человека**

Полноразмерный ген *PRAME* (NM\_006115.4) был заклонирован в вектор pCER4 для экспрессии в эукариотических клетках под контролем CMV-промотора. Методом прямого секвенирования подтверждено, что все составные части плазмиды и последовательность, кодирующая белок *PRAME*, полностью соответствуют оригинальной схеме конструирования. После трансфекции плазмидой pCER4-*PRAME* линии мышинной меланомы V16F10 были получены клетки, стабильно экспрессирующие человеческий белок *PRAME*, и определена прививочная доза  $2 \times 10^5$  клеток на мышью, обеспечивающая 100 % прививаемость для этих клеток. В полученной трансфицированной линии клеток мышинной меланомы V16F10 по данным ПЦР в реальном времени уровень экспрессии человеческого гена *PRAME* составлял  $27,4 \pm 1,6 \%$  относительно референс-гена ( $\beta$ -актин) по результатам 3 измерений в течение 1 мес культивирования.



**Рис. 1.** Анализ экспрессии белка PRAME в культуре клеток методом иммуноблоттинга: 1 – K562 клетки хронического миелолейкоза (человек); 2 – меланома мыши B16F10; 3 – клетки B16F10, трансфицированные контрольной плазмидой; 4 – клетки B16F10, трансфицированные плазмидой с геном PRAME

Экспрессия человеческого белка PRAME в данной трансфицированной линии подтверждена методом иммуноблоттинга (рис. 1) и методом проточной цитометрии (рис. 2).

#### Развитие гуморального ответа

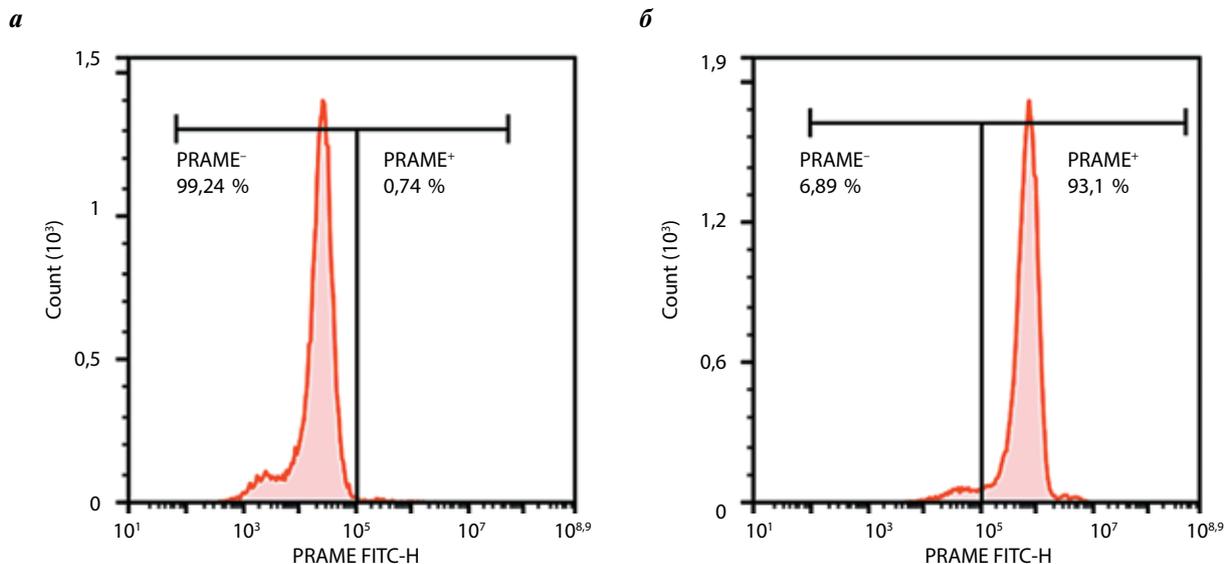
На момент трансплантации клеток опухоли, экспрессирующей белок PRAME, мыши были проиммунизированы 4 раза с двухнедельными интервалами рекомбинантным человеческим белком PRAME в растворе 0,9 % NaCl либо тем же белком в смеси с адьювантом. Схема эксперимента представлена на рис. 3. Мыши контрольной группы получали в том же режиме инъекции адьюванта или раствора 0,9 % NaCl. Таким образом, через 42 дня после первой иммунизации и перед прививанием опухоли в сыворотке мышей обнаруживался высокий титр специфических антител:  $1,76 \times 10^5$  у мышей, иммунизированных белком, и  $2,89 \times 10^5$  у мышей, иммунизированных смесью белка с адьювантом (рис. 4). У животных контрольных групп детектировался очень низкий уровень антител, сравнимый с фоновым сигналом, так как

они не получили инъекций антигена. По мере роста опухоли титр антител повысился до  $6,14 \times 10^5$  у животных, иммунизированных рекомбинантным белком с адьювантом, и  $3,07 \times 10^5$  у животных, иммунизированных только рекомбинантным белком; разница между этими величинами была статистически незначимой ( $p = 0,108$ ). При этом у неиммунизированных животных контрольных групп детектировалось лишь небольшое увеличение титра антител, до 840, что значительно ниже, чем в опытных группах ( $p = 0,025$ ). Появление антител к белку в сыворотке неиммунизированных животных на момент завершения эксперимента объясняется слабым эффектом иммунизации белком, присутствующим в привитой опухоли.

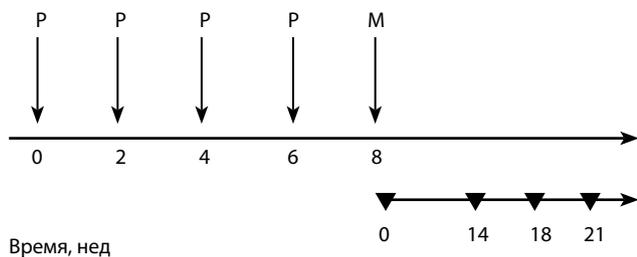
#### Рост PRAME-экспрессирующей меланомы B16F10 после профилактической иммунизации рекомбинантным белком PRAME

Мышам, иммунизированным антигеном PRAME с адьювантом или изотоническим раствором NaCl, подкожно были трансплантированы клетки PRAME-экспрессирующей меланомы B16F10. На рис. 5 и табл. 2 показано, что опухоль растет быстрее у животных контрольных групп, иммунизированных адьювантом или раствором 0,9 % NaCl.

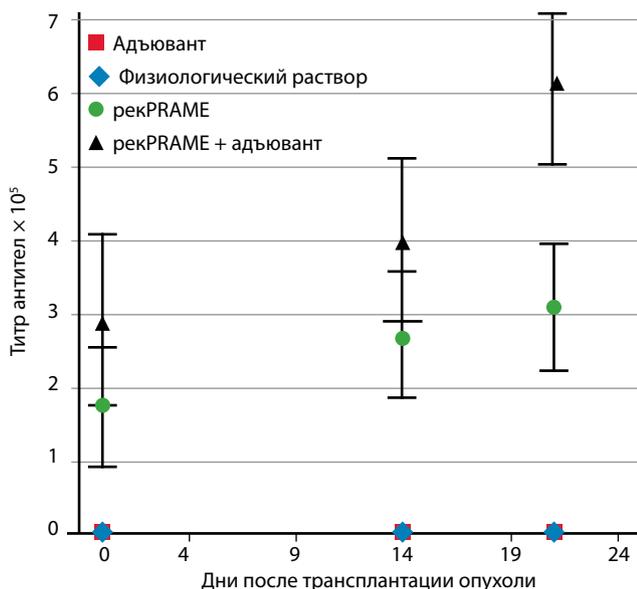
По окончании эксперимента (на 21-й день) в контрольных группах средний размер опухоли достигал  $700 \text{ мм}^3$ . Как следует из данных, представленных на рис. 6, на 21-й день размеры опухолей были значительно меньше у мышей, иммунизированных рекомбинантным белком PRAME ( $p = 0,1113$ ) или рекомбинантным белком PRAME с адьювантом ( $p = 0,0864$ ) по сравнению с группой, получившей только адьювант. При этом присутствие адьюванта при иммунизации



**Рис. 2.** Определение уровня экспрессии белка PRAME методом проточной цитометрии: а – клетки B16F10, трансфицированные контрольной плазмидой, б – клетки B16F10, трансфицированные плазмидой с геном PRAME

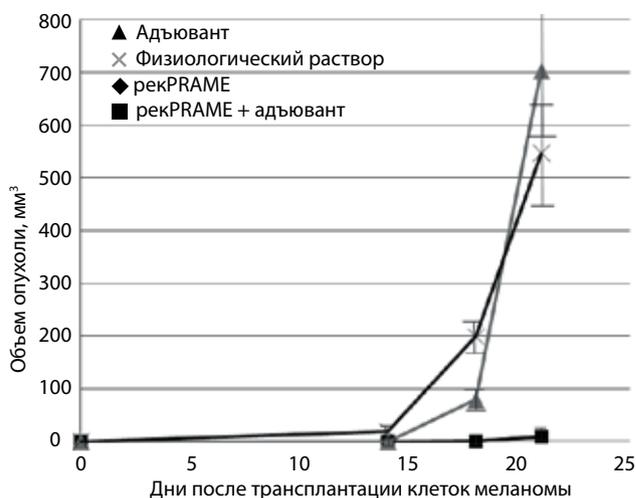


**Рис. 3.** Схема профилактической иммунизации рекомбинантным белком PRAME. P – иммунизация антигеном либо контрольным раствором; M – введение PRAME-экспрессирующей меланомы B16F10. Треугольники обозначают временные точки получения результатов измерений



**Рис. 4.** Титр специфических антител к рекомбинантному белку PRAME в сыворотке мышей с меланомой B16F10-PRAME

рекомбинантным белком PRAME не влияло на размер опухолей в опытных группах ( $p = 1$ ). Также заметно не различались контрольные группы, получившие адьювант и раствор 0,9 % NaCl ( $p = 0,8852$ ). Торможение роста опухоли рассчитывалось на момент окончания эксперимента относительно контрольной группы, получавшей только адьювант, и состав-



**Рис. 5.** Влияние профилактической иммунизации рекомбинантным белком PRAME на рост PRAME-экспрессирующей меланомы B16F10

ляло 98,41 и 98,64 % для групп, иммунизированных белком с адьювантом и чистым белком соответственно.

Таким образом, предварительная иммунизация мышей рекомбинантным человеческим белком PRAME значительно замедляет развитие меланомы B16F10, экспрессирующей человеческий антиген PRAME.

Поскольку уровень антител у предварительно иммунизированных белком мышей относительно значимо повысился за 21 день роста PRAME-экспрессирующей опухоли ( $p = 0,745$ ), вероятно, контакт иммунной системы с опухолью, несущей антиген, усиливает специфический гуморальный ответ. Известно, что клетки мышинной меланомы B16 способны вызывать преимущественно гуморальный и антителозависимый клеточный иммунный ответ [15], так как на их поверхности снижена экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости [16]. Гуморальный ответ на антиген PRAME является важным показателем, отражающим общую активацию иммунной системы, притом что в данном исследовании наибольшие титры антител наблюдались в группе животных с самой низкой скоростью развития опухоли, несущей специфический антиген. Определяет ли такой

**Таблица 2.** Размеры меланомы B16F10-PRAME в контрольных и опытных группах мышей

| Имуноген          | Срок измерения, сут.           |              |               | День   |       |
|-------------------|--------------------------------|--------------|---------------|--------|-------|
|                   | 14                             | 18           | 21            | 18-й   | 21-й  |
|                   | Объем опухоли, мм <sup>3</sup> |              |               | ТРО, % |       |
| Адьювант+рекPRAME | 0                              | 0,02 ± 0,003 | 11,2 ± 2,5    | 99,97  | 98,41 |
| рекPRAME          | 0                              | 1,0 ± 0,4    | 9,6 ± 2,1     | 98,74  | 98,64 |
| Адьювант          | 0                              | 79,5 ± 20,5  | 703,9 ± 123,8 | –      | –     |
| 0,9 % NaCl        | 19,25 ± 7,3                    | 199,7 ± 31,2 | 547,1 ± 110,2 | –      | –     |

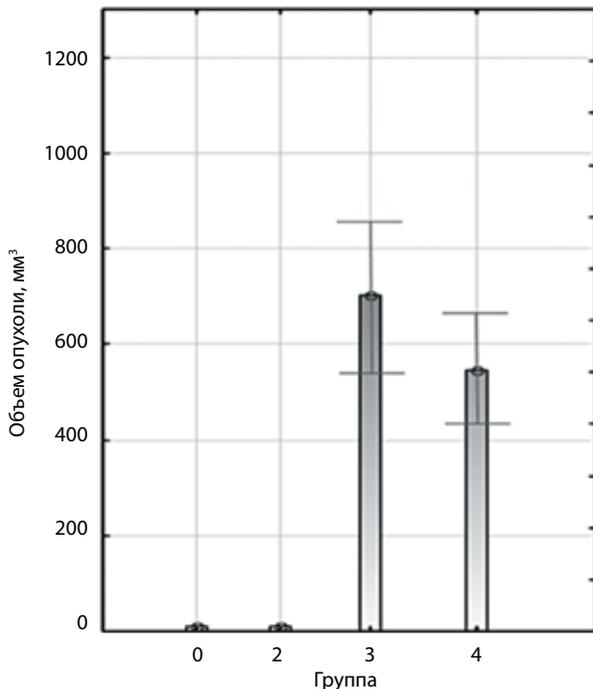


Рис. 6. Размеры меланомы B16F10-PRAME у мышей на 21-й день: 1 – рекPRAME + адъювант; 2 – рекPRAME; 3 – адъювант; 4 – физиологический раствор

иммунный ответ противоопухолевый эффект, можно будет узнать, проведя дополнительные эксперименты *in vitro* по изучению механизма действия специфических антител в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих антиген PRAME.

Похожие данные были получены на модели клеток карциномы кишечника СТ26, стабильно транс-

фицированной PRAME-экспрессирующей плазмидой [17], где также использовалась схема четырехразовой иммунизации животных рекомбинантным белком PRAME внутримышечно перед введением опухолевых клеток. При этом был достигнут значительный противоопухолевый эффект иммунизации при тех же порядках титров антител в сыворотке животных, что и в представленной работе. В другом исследовании [9] подобные результаты, но в отношении раково-тестикулярного антигена NY-ESO-1, были достигнуты и при двукратной подкожной иммунизации животных. Очевидно, схему иммунизации, дозу антигена и способ введения требуется подбирать экспериментально для каждого белка.

Раково-тестикулярный человеческий антиген PRAME интенсивно исследуется в качестве компонента противоопухолевых вакцин как в виде рекомбинантного белка [18, 19], где у пациентов после иммунизации был получен стойкий специфический гуморальный ответ, так и в виде синтетических пептидов, распознаваемых иммунной системой человека [20].

#### Заключение

Представленные результаты свидетельствуют о возможном противоопухолевом потенциале полученного рекомбинантного белка PRAME как антигена для иммунизации. В дальнейшем предстоит продолжить детальное изучение иммунного ответа, в том числе Т-клеточного, на рекомбинантный белок PRAME на различных моделях опухолей.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей. Вестник Московского онкологического общества 2008;1:6–10. [Baryshnikov A.Yu., Demidov L.V., Kadagidze Z.G. et al. Current problems of anti-cancer biotherapy. Vestnik Moskovskogo onkologicheskogo obshchestva = Bulletin of the Moscow Cancer Society 2008;1:6–10 (In Russ.).]
- Cheever M.A., Allison J.P., Ferris A.S. et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin Cancer Res 2009;15(17):5323–37. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0737. PMID: 19723653.
- Ikeda H., Lethé B., Lehmann F. et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. Immunity 1997;6:199–208. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80426-4. PMID: 9047241
- Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе. Терапевтический архив 2004;74(7):77–81. [Abramenko I.V., Belous N.I., Kryachok I.A. et al. Expression of PRAME gene in multiple myeloma. Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive 2004;74(7):77–81 (In Russ.).]
- Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Лукина А.Е. и др. Профили экспрессии раково-тестикулярных генов в клеточных линиях меланомы. Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии 2014;31(2):104–109. DOI: 10.7868/S0233475514020054. [Misyurin V.A., Misyurin A.V., Lukina A.E. et al. Cancer-testis Gene Expression Profile in Human Melanoma Cell Lines. Biologicheskoe membrany = Biological membranes 2014;31(2):104–9 (In Russ.).]
- Quintarelli C., Dotti G., Hasan S.T. et al. High-avidity cytotoxic T lymphocytes specific for a new PRAME-derived peptide can target leukemic and leukemic-precursor cells. Blood 2011;117:3353–62. DOI: 10.1182/blood-2010-08-300376. PMID: 21278353.
- Rezvani K., Yong A.S., Tawab A. et al. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and

- acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009;113:2245–55. DOI: 10.1182/blood-2008-03-144071. PMID: 18988867.
8. Luetkens T., Schafhausen P., Uhlich F. et al. Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2010;34(12):1647–55. DOI: 10.1016/j.leukres.2010.03.039. PMID: 20409582.
  9. Maraskovsky E., Sjölander S., Drane D. et al. NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ t-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10(8):2879–90. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0245. PMID: 15102697.
  10. Hance K., Zeytin H., Greiner J. Mouse models expressing human carcinoembryonic antigen (CEA) as a transgene: evaluation of CEA-based cancer vaccines. *Mutat Res* 2005; 576(1–2):132–54. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.10.014. PMID: 15888344.
  11. Chiriva-Internati M., Yu Y., Mirandola L. et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One* 2010;5(5):e10471. DOI: 10.1371/journal.pone.0010471. PMID: 20485677.
  12. Финашутина Ю.П., Мисюрин А.В., Ахлынина Т.В. и др. Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональ-ных антител к нему. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(3):29–36. [Finashutina Yu.P., Misyurin A.V., Akhlynina T.V. et al. Production of recombinant PRAME cancer testis antigen and its specific monoclonal antibodies. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(3):29–36. (In Russ)].
  13. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;224: 680–5. DOI: 10.1038/227680a0. PMID: 5432063.
  14. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1.* Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятыян и др. М.: Гриф и К, 2012:642–57. [Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Guidance on pre-clinical study of antitumor activity of drugs. In: *Guide to conduct preclinical studies of drugs. Part 1.* Eds. A.N. Mironov, N.D. Bunyatyan et al. Moscow: Grif i K, 2012:642–57 (In Russ.)].
  15. Eisenthal A., Lafreniere R., Letor A. et al. Effect of anti-B<sub>16</sub> melanoma monoclonal antibody on established murine B16 melanoma liver metastases. *Cancer Res* 1987;47:7140–5. PMID: 3494504.
  16. Seliger B., Wollscheid U., Momburg F. et al. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2001;61(3):1095–9. PMID: 11221838.
  17. Gérard C., Baudson N., Ory T. et al. A comprehensive preclinical model evaluating the recombinant PRAME antigen combined with the AS15 immunostimulant to fight against PRAME-expressing tumors. *J Immunother* 2015;38(8):311–20. DOI: 10.1097/CJI.000000000000095. PMID: 26325375.
  18. Pujol J., De Pas T., Rittmeyer A. et al. Safety and Immunogenicity of the PRAME Cancer Immunotherapeutic in Patients with Resected Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase I Dose Escalation Study. *J Thorac Oncol* 2016;11(12):2208–17. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.08.120. PMID: 27544054.
  19. Gutzmer R., Rivoltini L., Levchenko E. et al. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study. *ESMO Open* 2016;1(4):e000068. DOI:10.1136/esmoopen-2016-000068. PMID: 27843625.
  20. Weber J.S., Vogelzang N.J., Ernstoff M.S. et al. A phase I study of a vaccine targeting preferentially expressed antigen in melanoma and prostate-specific membrane antigen in patients with advanced solid tumors. *J Immunother* 2011;34(7):556–67. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182280db1. PMID: 21760528.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# ЭКСПРЕССИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО МАРКЕРА ЦИТОКЕРАТИНА СК19 У МЫШЕЙ С АДЕНОКАРЦИНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФИТОАНТИЭСТРОГЕНА СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА

И.Ж. Шубина, Е.М. Трещалина, С.А. Кузнецов, Г.Б. Смирнова, Ю.А. Борисова,  
С.М. Ситдикова, М.В. Киселевский, З.С. Шпрах

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Ирина Жановна Шубина irinashubina@mail.ru

**Введение.** Эффективность фитоантиэстрогена секоизоларицирезинола (СЕКО) из группы лигнанов аналогична эффективности селективного модулятора эстрогенных рецепторов тамоксифену (ТАМ) на эстрогенпозитивных моделях рака молочной железы (РМЖ) мышей и человека *in vivo*. Тамоксифен в силу антагонистических и агонистических свойств одновременно с эффективной профилактикой метастазирования РМЖ увеличивает риск развития аденокарциномы матки. Влияние СЕКО на пролиферативную активность циркулирующих опухолевых клеток, а также их способность к прогрессии (образование скрытых метастазов) не изучена.

**Цель исследования** – оценка риска диссеминации опухолевых клеток у мышей с перевиваемой аденокарциномой молочной железы под действием СЕКО в сравнении с ТАМ.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на мышах линии BDF<sub>1</sub> [C<sub>57</sub>Bl<sub>6j</sub> × DBA<sub>2j</sub>] с подкожно привитой карциномой молочной железы Ca755. Для выявления диссеминированных опухолевых клеток использовали эпителиальный маркер – внутриклеточный цитокератин СК19. Оценку содержания СК19-положительных клеток в циркуляции и костном мозге животных проводили методом проточной цитометрии и иммунофлуоресцентной микроскопии через 24 ч после 10-дневного введения СЕКО (в эффективной разовой дозе 250 мг/кг) или ТАМ (в разовой дозе 50 мг/кг).

**Результаты.** В группах мышей, получавших СЕКО и ТАМ, величины среднего геометрического интенсивности флуоресценции (GMFI) для экспрессии СК19 в крови составили 28,87 ± 13,70 и 28,02 ± 9,50 соответственно; в контрольной группе роста опухоли (КРО) без лечения – 31,94 ± 5,02. Показатель GMFI экспрессии СК19 в костном мозге в группах СЕКО, ТАМ и КРО составил 30,14 ± 2,33; 39,07 ± 2,30 и 32,48 ± 3,75 соответственно.

**Заключение.** В результате установлено, что у мышей с аденокарциномой молочной железы Ca755, чувствительной к СЕКО или ТАМ, показатели экспрессии СК19 в клетках периферической крови имеют близкие значения и достоверно отличаются от такового в контрольной группе животных. В костном мозге мышей-опухоленосителей показатель GMFI экспрессии СК19 в группе СЕКО был достоверно ниже по сравнению с этим показателем в группе ТАМ ( $p = 0,0003$ ). Данные, полученные на мышинной модели, свидетельствуют в пользу низкого риска потенцирования диссеминации клеток аденокарциномы молочной железы при применении фитоантиэстрогена СЕКО по терапевтической схеме.

**Ключевые слова:** фитоантиэстроген, секоизоларицирезинол, СК19, опухолевая диссеминация

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-43-49

## EXPRESSION OF EPITHELIAL MARKER CK19 IN MICE WITH MAMMARY ADENOCARCINOMA AFTER EXPOSURE TO FITO-ANTI-ESTROGEN SECOISOLARICIREBINOL

I.Zh. Shubina, E.M. Treshalina, S.A. Kuznetsov, G.B. Smirnova, Yu.A. Borisova, S.M. Sitdikova, M.V. Kiselevsky, Z.S. Shprakh

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** Phyto-anti-estrogen secoisolariciresinol (SECO) has similar effectiveness to that of Tamoxifen (TAM), a member of selection estrogen receptor modulators, in estrogen-positive models of murine mammary adenocarcinoma and human breast cancer *in vivo*. Due to its antagonistic and agonistic functions Tamoxifen may enhance risk of development of uterine adenocarcinoma while providing effective prophylactics of breast cancer metastases. SECO effect on proliferative activity of circulating or disseminating tumor cells (occult metastases) is still unclear. We used epithelial cell marker – intracellular cytokeratin 19 (CK19) to study SECO function in terms of possible metastatic process, since prognostic significance of CK19 is well established for identifying occult metastases and breast cancer dissemination.

**Objective.** To evaluate risk of tumor cell dissemination in mice with transplanted mammary adenocarcinoma after exposure to SECO and TAM.

**Materials and methods.** Mice BDF<sub>1</sub> [C<sub>57</sub>Bl<sub>6j</sub> × DBA<sub>2j</sub>] bearing Ca755 of the 3<sup>rd</sup> passage were used for the experiments. CK19 expression was evaluated 24 hours after 10-day course of SECO in the effective single doses of 250 mg/kg or TAM 50 mg/kg. Flow cytometry, immunofluorescence with light and luminescence microscopy were performed to evaluate CK19 expression.

**Results.** Parameter GMFI ± SD (geometric mean fluorescence intensity ± SD) for CK19 expression in SECO and TAM groups in blood accounted for 28.87 ± 13.70 and 28.02 ± 9.50 and in control tumor growth (CTG) group GMFI ± SD was 31.94 ± 5.02; while in bone marrow it was 30.14 ± 2.33, 39.07 ± 2.30 and 32.48 ± 3.75, respectively.

**Conclusion.** The results of the study showed similar expression of epithelial intracellular marker CK19 in blood in the studied groups of mice bearing mammary adenocarcinoma Ca755 sensitive to SECO and TAM exposure. GMFI for CK19 expression in bone marrow was lower in SECO group than in TAM ( $p = 0.0003$ ). The data obtained in the murine model demonstrated no enhanced risk of tumor cell dissemination while performing treatment by phyto-anti-estrogen SECO in therapeutic regimen.

**Key words:** phyto-anti-estrogen, secoisolariciresinol, CK19, tumor dissemination

## Введение

Новый пероральный фитоантиэстроген из группы лигнанов (полифенольные соединения) секоизоларицирезинол (СЕКО) со свойствами селективных модуляторов эстрогенных рецепторов при доклиническом изучении на эстроген-позитивных опухолевых моделях рака молочной железы (РМЖ) животных и человека показал эффективность, аналогичную эффективности тамоксифена (ТАМ) [1–9]. При этом известно, что ТАМ в силу антагонистических и агонистических свойств наряду с эффективной профилактикой метастазирования РМЖ стимулирует пролиферацию эндометрия и увеличивает риск развития аденокарциномы матки [10, 11]. Для изучения влияния СЕКО на содержание диссеминированных опухолевых клеток в периферическом кровотоке и костном мозге использован маркер эпителиальных клеток – внутриклеточный цитокератин СК19, для которого хорошо подтверждена прогностическая значимость в отношении выявления скрытого метастазирования при РМЖ.

Экспрессия СК19 в диссеминированных опухолевых клетках визуализируется практически с одинаковой чувствительностью различными методами: при помощи полимеразной цепной реакции, иммунофлуоресценции или методом проточной цитометрии. Получение доказательных данных, как правило, достигается сочетанием этих методов [12–17]. Показана перспективность детекции циркулирующих опухолевых клеток с иммунофенотипом CD45<sup>-</sup>/СК8/18<sup>+</sup>/СК19<sup>+</sup> при эпителиальных опухолях различных локализаций, демонстрирующая высокую частоту выявления опухолевых клеток у больных генерализованными формами злокачественных новообразований [18, 19].

В данной работе для определения *in vivo* влияния фитоантиэстрогена СЕКО на содержание СК19<sup>+</sup> клеток использованы 2 из 3 перечисленных методов. В качестве препарата сравнения использован ТАМ в оптимальной схеме применения.

**Цель и задачи исследования** – оценка риска диссеминации опухолевых клеток в крови и костном

мозге мышей с перевиваемой аденокарциномой молочной железы под действием СЕКО или ТАМ при помощи маркера СК19.

## Материалы и методы

### Лабораторные животные

В опытах использованы мыши, полученные из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Мышей содержали в виварии отдела экспериментальных животных ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В эксперименте использовали 30 мышей-самок гибридов BDF<sub>1</sub> [C<sub>57</sub>Bl<sub>6j</sub> × DBA<sub>2j</sub>] (2 здоровые особи – для группы интактного контроля, 28 особей – для трансплантации опухоли и/или лечения). В качестве доноров опухолевого материала Ca755 использованы 4 мыши-самки линии C<sub>57</sub>Bl<sub>6j</sub>. Масса тела всех мышей – 19–20 г.

Группы мышей:

- группа контроля роста опухоли (КРО,  $n = 5$ ): мышам трансплантировали опухоль и давали перорально 1 %-ный раствор крахмального клейстера в сроки и режиме, аналогичном применению агентов;
- группа СЕКО ( $n = 17$ ): мышам трансплантировали опухоль и проводили лечение субстанцией СЕКО;
- группа ТАМ ( $n = 17$ ): мышам трансплантировали опухоль и проводили лечение аптечным препаратом ТАМ.

### Опухолевая модель

Использован штамм гормонозависимой аденокарциномы молочной железы мышей Ca755 из криохранилища банка ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, показавший ранее чувствительность к СЕКО или ТАМ [2–4]. В опытах использовали 3-ю генерацию опухоли *in vivo*. Инокулят готовили *ex tempore* в питательной среде 199 и трансплантировали мышам под кожу бока по 40 мг опухолевой ткани в 0,4 мл 10 % взвеси. Все исследования на мышях с опухолями проведены

и проанализированы в соответствии с действующими в Российской Федерации методическими рекомендациями [20].

#### **Секоизолярицеризинол**

Для опытов использован СЕКО производства ЗАО «Биохиммак СТ» (Россия). Мыши группы СЕКО получали субстанцию СЕКО перорально ежедневно в течение 10 сут (3–12) в разовой дозе 250 мг/кг. Взвесь СЕКО в 1 %-ном растворе крахмального клейстера вводили в желудок каждой мыши с помощью металлического зонда.

#### **Тамоксифен**

Клинический селективный модулятор рецепторов эстрогенов аптечный ТАМ в таблетках по 10 мг («Эбеве», Швейцария) использован в качестве референсного препарата для СЕКО как функциональный аналог. Таблетку ТАМ предварительно растирали в фарфоровой ступке, а затем растворяли в питьевой воде. Мышам вводили ТАМ в разовой дозе 50 мг/кг в режиме ежедневного перорального введения в желудок с помощью металлического зонда в течение 10 сут (3–12).

#### **Материал для иммунологического и иммунохимического исследований**

На 1-е сутки после лечения СЕКО или ТАМ всех мышей умерщвляли с помощью декапитации. Образцы периферической крови (ПК) по 0,5 мл от каждой мыши собирали в гепаринизированные пробирки. Образцы костного мозга (КМ) забирали с помощью инъекционного шприца из 2 бедренных костей от каждой мыши, после чего помещали в пробирки с физиологическим раствором и подвергали соответствующему исследованию.

#### **Завершение экспериментов**

Для взятия материала и после завершения эксперимента мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза. Трупы кремировали в специализированном подразделении ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Манипуляции, умерщвление и кремация мышей выполнены с учетом международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, изложенных в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, а также требований Хельсинкской декларации и Всемирной медицинской ассоциации [21, 22].

#### **Проточная цитометрия**

Для визуализации маркера использованы моноклональные антитела (МКА) к СК19 (A53-B/A2.26;

Cell Marque, США) и МКА к IG1, меченные FITC (BD Biosciences, США). Образцы КМ и ПК от мышей с опухолью обрабатывали стандартно с применением пермеабиллизации (изменение проницаемости мембраны клетки). Полученный материал КМ отмывали центрифугированием при 300 г в течение 3 мин в 1 мл раствора Хэнкса без красителя («ПанЭко», Россия), осадок ресуспендировали и инкубировали в 1 мл холодного свежеприготовленного фиксирующего/пермеабиллизирующего буфера (Permeabilization Kit, BD Biosciences, США) в темноте при 4 °С в течение 30 мин. Затем все клетки дважды отмывали в 1 мл холодного буфера центрифугированием при 300 г в течение 3 мин при 4 °С. После блокировки Fc-рецепторов соответствующим реагентом в объеме 20 мкл к клеткам добавляли 10 мкл МКА СК19 (меченных FITC). Затем суспензию клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. После отмывки центрифугированием при 300 г в течение 3 мин при 4 °С осажденную популяцию клеток использовали для исследования на проточном цитофлуориметре.

Окрашивание образцов ПК МКА СК19 проводили таким же способом, при этом на последнем этапе добавляли лизирующий буфер OptiLyse C (BD Biosciences, США) для лизиса эритроцитов. Полученные окрашенные пробы использовали для последующего измерения на проточном цитофлуориметре FACS CANTO II (Becton Dickinson, США). Данные анализировали с помощью программы WinMDI 2.8 по показателю GMFI (Geometrical Mean Fluorescence Intensity) – параметру, отражающему среднее геометрическое величины интенсивности флуоресценции клеток при использовании логарифмической шкалы подсчета с оценкой соответствующей величины стандартного отклонения ( $\pm$ SD).

#### **Флуоресцентная микроскопия**

Визуализацию экспрессии внутриклеточного маркера СК19 проводили с использованием флуоресцирующих FITC-меченных МКА к СК19. Прижизненную флуоресцентную, а также световую микроскопию и фотографирование клеток выполняли с использованием люминесцентного микроскопа, соответствующих светофильтров, а также цифровой системы регистрации и анализа изображения (Zeiss Axio Vision, Германия).

#### **Результаты**

Результаты оценки характера распределения и интенсивность флуоресценции маркера СК19 по показателю GMFI в ПК и КМ мышей с подкожно привитой аденокарциномой Ca755, получавших лечение СЕКО или ТАМ, представлены в таблице.

Экспрессия СК19 в клетках периферической крови и костного мозга мышей с аденокарциномой Ca755 после лечения секоизоларицирезинолом или тамоксифеном

| Группа                 | Экспрессия СК19 (GMFI $\pm$ SD) |                      |
|------------------------|---------------------------------|----------------------|
|                        | костный мозг                    | периферическая кровь |
| Контроль роста опухоли | 32,48 $\pm$ 3,75                | 31,94 $\pm$ 5,02     |
| Секоизоларицирезинол   | 30,14 $\pm$ 2,33                | 28,87 $\pm$ 13,70    |
| Тамоксифен             | 39,07 $\pm$ 2,30*               | 28,02 $\pm$ 9,50     |

**Примечание.** GMFI – среднее геометрическое интенсивности флуоресценции клеток при использовании логарифмической шкалы подсчета; SD – стандартное отклонение, \* $p < 0,05$ .

Как видно из представленных данных, показатель GMFI экспрессии СК19 в клетках КМ в группе мышей, получавших инъекции СЕКО, оказался близким к показателю в контрольной группе животных (отличия статистически недостоверны) и достоверно ниже, чем у животных, получавших лечение ТАМ ( $p = 0,0003$ ). Показатель GMFI экспрессии СК19 в костном мозге мышей после лечения ТАМ достоверно превышал таковой в контрольной группе животных ( $p = 0,01$ ).

По результатам анализа образцов ПК животных-опухоленосителей в группах мышей, получавших лечение СЕКО или ТАМ, показатели GMFI для экспрессии СК19 были сходными, а величины GMFI в этих группах были ниже, чем в контрольной группе животных (различия статистически недостоверны).

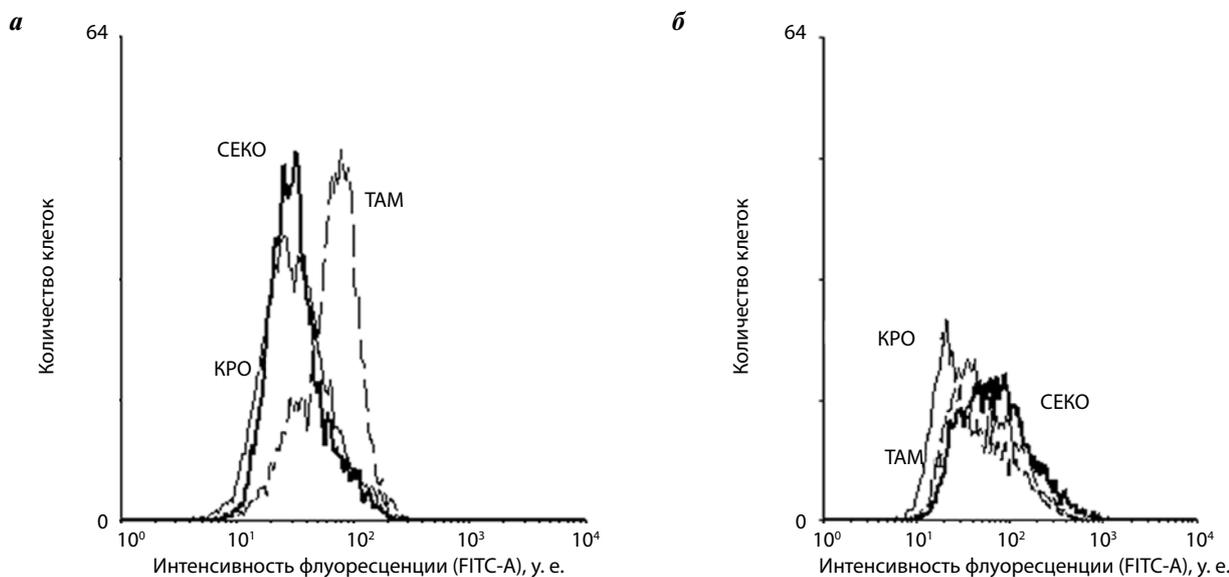
Приведенные на рис. 1 гистограммы демонстрируют уровень интенсивности флуоресценции и характер распределения окрашенных МКА к СК19 клеток в образцах КМ и ПК мышей-опухоленосителей в контрольной группе и в группах, получавших лечение СЕКО или ТАМ.

Иммунофлуоресцентный анализ при микроскопическом исследовании позволил выявить в КМ единичные СК19<sup>+</sup> клетки у мышей с привитой опухолью во всех группах (рис. 2).

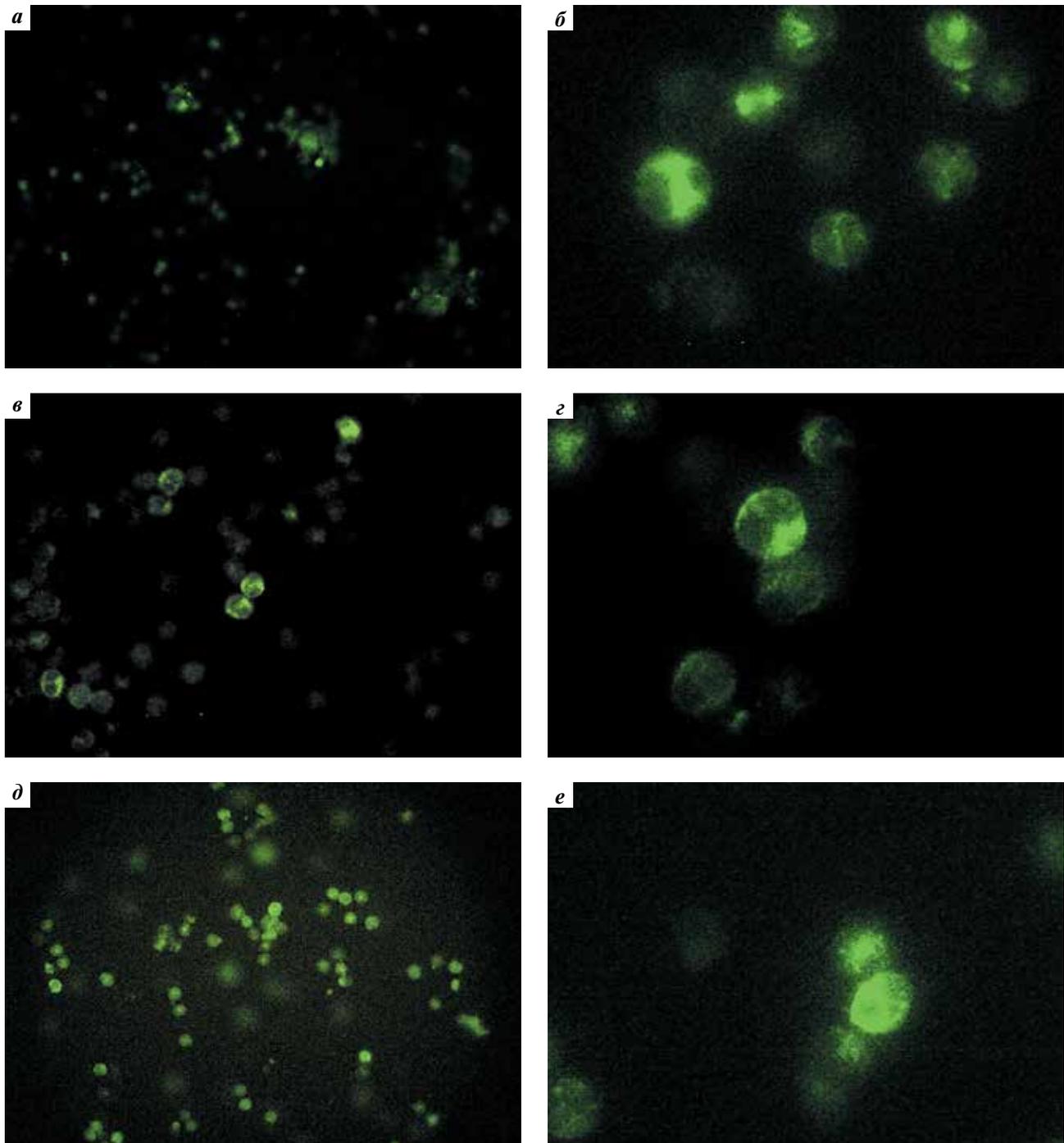
### Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что в ПК и КМ мышей с гормонозависимой аденокарциномой молочной железы Ca755 выявляются клетки, экспрессирующие эпителиальный маркер СК19. Этот феномен свидетельствует о том, что известная в экспериментальной онкологии как метастазирующая аденокарцинома молочной железы Ca755 у мышей-самок BDF<sub>1</sub> при подкожной перевивке в течение 14 дней роста диссеминирует в КМ, т. е. дает скрытые микрометастазы. Оценка опухолевой диссеминации по числу и интенсивности флуоресценции СК19<sup>+</sup> клеток после проведения у животных-опухоленосителей лечения антиэстрогенами выявила более низкие показатели экспрессии СК19 в КМ мышей, получавших СЕКО, по сравнению с группой ТАМ.

Данные, полученные на мышинной модели, свидетельствуют о том, что терапия СЕКО в эффективных дозах не сопровождается усилением диссеминации клеток мышинной гормонозависимой аденокарциномы молочной железы Ca755 в КМ.



**Рис. 1.** Гистограммы распределения СК19<sup>+</sup> клеток в КМ и ПК мышей с аденокарциномой Ca755, получавших СЕКО или ТАМ в терапевтических дозах: а – костный мозг; б – периферическая кровь; контроль флуоресценции МКА (FITC)



**Рис. 2.** Иммунофлуоресценция SKI9<sup>+</sup> клеток в костном мозге мышей с аденокарциномой Ca755 в контрольной группе (КРО) и в группах животных, получавших лечение секоизоларицезиномом (СЕКО) или тамоксифеном (ТАМ) в терапевтических дозах: а – КРО, × 40; б – КРО, × 100; в – СЕКО 250 мг/кг десятикратно, × 140; г – СЕКО 250 мг/кг десятикратно, × 100; д – ТАМ 50 мг/кг десятикратно, × 40; е – ТАМ 50 мг/кг десятикратно, × 1100

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Milder I.E., Arts I.C., van de Putte B. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br. J Nutr* 2005;93(3):393–402. DOI: 10.1079/BJN20051371.
- Нифантьев Н.Э., Яшунский Д.В., Меньшов В.М. Патент РФ 2359666, 2009. Способ выделения секоизола-рицирезинола и дигидрокверцетина из древесины. [Nifantjev N.E., Yashunsky D.V., Menshov V.M. Patent RU 2359666, 2009. Method of isolation of secoisolariciresinol and dihydroquercetin from wood (In Russ.)].
- Седакова Л. А., Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Трещалина Е.М. Результаты скрининга нового фитоантиэстрогена секоизола-рицирезинола на гормонозависимой опухолевой модели *in vivo*. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(2):73. [Sedakova L.A., Smirnova G.B., Borisova Yu.A., Treschalina E.M. Results of screening of the new phyto-anti-estrogen secoisolariciresinol in a hormone-dependent tumor model *in vivo*. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2013;12(2):73 (In Russ.)].
- Седакова Л.А., Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б., Трещалина Е.М. Сравнительная эффективность секоизола-рицирезинола и тамоксифена, в том числе в комбинации с ари-мидексом. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(2):73. [Sedakova L.A., Borisova Yu.A., Smirnova G.B., Treschalina E.M. Comparative effectiveness of secoisolariciresinol and tamoxifen including that in combination with arimidex. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2013;12(2):73 (In Russ.)].
- Седакова Л.А., Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б., Трещалина Е.М. Действие нового антиэстрогенного препарата секоизола-рицирезинола на рост запущенной эстрогензависимой опухоли и метастазирование меланомы В16/F10. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(3):74. [Sedakova L.A., Borisova Yu.A., Smirnova G.B., Treschalina E.M. Effect of the new anti-estrogenic drug secoisolariciresinol on the growth of estrogen-dependent advanced tumor and metastases of melanoma B16/F10. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2013;12(3):74 (In Russ.)].
- Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б., Райхлин Н.Т., Трещалина Е.М. Результаты скрининга фитоантиэстрогена секоизола-рицирезинола на эстрогензависимой аденокарциноме молочной железы Ca755. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*, 2014;25(1–2):26–30. [Borisova Yu.A., Smirnova G.B., Reichlin N.T., Treschalina E.M. Results of screening of phytoantiestrogen secoisolariciresinol on estrogen-dependent adenocarcinoma of the mammary gland Ca755. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center* 2014;25(1–2):26–30 (In Russ.)].
- Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б., Андронов Н.В. и др. Результаты доклинического изучения секоизола-рицирезинола на опухолевых моделях *in vivo*. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2014;25(3–4):43–6. [Borisova Yu.A., Smirnova G.B., Andronova N.V. et al. Results of preclinical study of secoisolariciresinol on tumor models *in vivo*. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center* 2014;25(3–4):43–6 (In Russ.)].
- Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б., Андронов Н.В. и др. Результаты доклинического изучения секоизола-рицирезинола на подкожных ксенографтах рака молочной железы человека. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2015;26(1):47–51. [Borisova Yu.A., Smirnova G.B., Andronova N.V. et al. Results of preclinical study of secoisolariciresinol on subcutaneous xenografts of human breast cancer. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center* 2015;26(1):47–51 (In Russ.)].
- Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б., Шубина И.Ж. и др. Фитоэстрогены – потенциальные селективные модификаторы биологически активных реакций при раке молочной железы. *Российский онкологический журнал* 2016;21(4):212–9. [Borisova Yu.A., Smirnova G.B., Shubina I.Zh. et al. Phytoestrogens are potential selective modifiers of biologically active reactions in breast cancer. *Rossiysky Onkologicheskyy Zhurnal = Russian Journal of Oncology* 2016;21(4):212–9 (In Russ.)].
- Neis K.J., Brandner P., Schlenker M. Tamoxifen-induced hyperplasia of the endometrium. *Contrib Gynecol Obstet* 2000;20:60–8. PMID: 11791286.
- Дмитриева Е.В., Пустотина О.А., Костин И.Н. Состояние эндометрия у женщин, получающих адъювантную терапию тамоксифеном после хирургического лечения рака молочной железы. *Вестник РУДН* 2013;5:219–24. [Dmitrieva E.V., Pustotina O.A., Kostin I.N. Status of endometrium in women receiving adjuvant therapy with tamoxifen after surgical treatment of breast cancer. *Vestnik RUDN = Journal of Peoples' Friendship University of Russia* 2013;5:219–24 (In Russ.)].
- Xenidis N., Mavroudis D., Kalmanti L. et al. Effect of adjuvant Tamoxifen and Letrozol on the fate of peripheral blood CK-19 mRNA+ cells in patients with early breast cancer. *Ann Oncol* 2007;18:1623–31. DOI: 10.1093/annonc/mdm208.
- Saloustros E., Perraki M., Apostolaki S. et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse. *Breast Cancer Research* 2011;13(R60): 2–11. DOI: 10.1186/BCR2897.
- Braun S., Pantel K., Muller P. et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342:525–33. DOI: 10.1056/NEJM200002243420801. PMID: 10684910.
- Stathopoulou A., Onikolis I., Mavroudis D. et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002;20:3404–12. DOI: 10.1200/JCO.2002.08.135. PMID: 12177100.
- Wang L., Wang Y., Liu Y. et al. Flow cytometric analysis of CK19 expression in the peripheral blood of breast carcinoma patients: relevance for circulating tumor cell detection. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28(1):57. DOI: 10.1186/1756-9966-28-57.
- Шубина И.Ж., Борисова Ю.А., Смирнова Г.Б. и др. Диссеминация клеток аденокарциномы молочной железы Ca755 в костный мозг мышей на фоне селективных модификаторов эстрогеновых рецепторов (СМЭР). *Российский биотерапевтический журнал* 2015;13(1):146–7. [Shubina I.Zh., Borisova Yu.A., Smirnova G.B. et al. Dissemination of adenocarcinoma cells of the mammary

- gland Ca755 into the bone marrow of mice against the background of selective modifiers of estrogen receptors(SMER). Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;13(1):146–7. (In Russ.).
18. Sparano J., O'Neill A., Alpaugh K. et al. Circulating tumor cells five years after diagnosis are prognostic for late recurrence in operable stage II–III breast cancer. 2018; San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract GS6–03.
19. Кит О.И., Новикова И.А., Селютина О.Н. и др. Исследование уровня ЦОК при эпителиальных опухолях различных локализаций. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований 2015;12(5):817–20. [Kit O.I., Novikova I.A., Selutina O.N. et al. Study of the CSC level in epithelial tumors of various localizations. Mezhdunarodny Zhurnal Prikladnykh i Fundamentalnykh Issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research. 2015;12(5):817–20 (In Russ.)].
20. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–657. [Treshalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Guidelines for pre-clinical study of antitumor activity of drugs. Part one. M.: Grif i K, 2012. P. 642–657 (In Russ.)].
21. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. ЕЭС. Страсбург, 1985. Анималогия 1993;1:29. [European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, EEC, Strasbourg, 1985; Animalogiya = Animalogy1993;1:29 (In Russ.)].
22. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002;1:54–9. [Bolshakov O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan R.V. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. Kachestvennaya Klinicheskaya Praktika = Quality clinical practice. 2002;1:54–9 (In Russ.)].

**ORCID авторов / ORCID of authors**

И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <http://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

С.М. Ситдикова / S.M. Sitdikova: <http://orcid.org/0000-0002-2840-1186>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevsky: <http://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

## ЧАСТОТА ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИНКИНАЗЫ ГЕНА *ALK* И ОНКОБЕЛКА TAG-72 ПРИ ПЕРВИЧНОЙ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

К.С. Титов<sup>1</sup>, Д.Л. Ротин<sup>2</sup>, А.М. Казаков<sup>3</sup>, О.Ю. Михеева<sup>1</sup>, И.М. Тележникова<sup>1</sup>, Д.А. Рябчиков<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Московский клинический научный центр ДЗМ»; Россия, 111123 Москва, ш. Энтузиастов, 86;

<sup>2</sup>ГБУЗ «ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ»; Россия, 123001 Москва, Мамоновский пер., 7;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

<sup>4</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

**Контакты:** Алексей Михайлович Казаков [hordavii@yandex.ru](mailto:hordavii@yandex.ru)

**Цель исследования** — определить частоту экспрессии тирозинкиназы мутированного гена *ALK* и онкобелка TAG-72 у пациентов с первичной меланомой кожи, определить их связь с рядом гистологических параметров и оценить диагностическую ценность определения *ALK* и TAG-72.

**Материалы и методы.** Для рутинного гистологического исследования материал фиксировали 10 %-ным нейтральным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование с моноклональными антителами D57.3 к *ALK* проводилось на иммунопейнере Ventana, с антителами B72.3 к TAG-72 на иммунопейнере Thermo Fischer.

**Результаты.** *ALK*-мутация была обнаружена в 7 (12 %), TAG-72 — в 4 случаях из 40. Оценка корреляционной силы между экспрессией *ALK* и TAG-72 показала прямую среднюю силу связи (коэффициент корреляции составлял 0,31). Была выявлена прямая связь средней силы между наличием у пациента онкомаркера TAG-72, мутации *ALK* и изъязвлением — коэффициент корреляции составил 0,53 и 0,68 соответственно. Наблюдалась статистически значимая связь между наличием *ALK* и лимфоидной инфильтрацией, которая в большинстве случаев была выраженной ( $p < 0,05$ ).

**Выводы.** Сопоставляя позитив признака экспрессии *ALK* (17,5 %) и TAG-72 (10 %) и позитив их одновременного обнаружения (7,5 %), можно сделать вывод о том, что дальнейшие исследования по определению их диагностической ценности перспективны. Наличие выраженной лимфоидной инфильтрации у *ALK*-позитивных пациентов претендует на диагностическое значение при первичной меланоме кожи.

**Ключевые слова:** меланома, *ALK*, лимфоидная инфильтрация

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-50-54

### EXPRESSION RATE OF ALK TYROSINE KINASE AND TAG-72 ONCOPROTEIN IN PRIMARY SKIN MELANOMA

K.S. Titov<sup>1</sup>, D.L. Rotin<sup>2</sup>, A.M. Kazakov<sup>3</sup>, O.U. Mischeeva<sup>1</sup>, I.M. Telezhnikova<sup>1</sup>, D.A. Ryabchikov<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Health Department; 86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia;

<sup>2</sup>S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Health Department; 7 Mamonovsky Pereulok, Moscow 123001, Russia;

<sup>3</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

<sup>4</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Objective.** Determine the frequency of occurrence of tyrosine kinase expression of the mutated *ALK* and TAG-72 gene among patients with primary melanoma of the skin, to identify their association with a number of histological parameters, and to assess the diagnostic value of the determination of *ALK* and TAG-72.

**Materials and methods.** Paraffin blocks with surgical material from 40 patients with primary skin melanoma. For routine histological examination, the material was fixed with 10 % neutral formalin for 24 h, poured into paraffin, sections were prepared with a thickness of 4–5 μm, stained with hematoxylin and eosin. IHC study with monoclonal antibodies D57.3 to *ALK* was performed on an immunostender — Ventana, with antibodies B72.3 to TAG-72 — on Thermo Fischer. As a detection system used: Envision — for TAG-72 and Ventana — for *ALK*.

**Results.** *ALK* mutation was detected in 7 (12 %), TAG-72 — 4 (10 %) cases. Evaluation of the correlation force between the presence of *ALK* and TAG-72 showed a direct average coupling strength (correlation coefficient was 0.31). A direct correlation of the mean force between the presence of TAG-72 oncoprotein, *ALK* mutation and ulceration in the patient was found — the correlation coefficient was 0.53 and 0.68, respectively. There was a statistically significant association between the presence of *ALK* and lymphoid infiltration, which in most cases (57 %) was pronounced ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** Comparing the positive sign of the expression of *ALK* — 17.5 % and TAG-72 — 10 %, and the positive of their simultaneous detection — 7.5 %, it can be concluded that further studies to determine their diagnostic value are promising. The presence of severe lymphoid infiltration in *ALK*-positive patients claims a diagnostic value in primary skin melanoma.

**Key words:** melanoma, *ALK*, lymphoid infiltration

### Введение

На долю меланомы приходится около 4 % всех форм злокачественных опухолей кожи, однако 80 % смертей в данной группе обусловлено именно меланомой. Заболеваемость меланомой кожи в России и многих странах мира неуклонно растет: ежегодно на 5 %. За последние 10 лет в нашей стране заболеваемость меланомой кожи увеличилась на 52 %, а смертность – на 18 %. По абсолютному приросту заболеваемости среди всех злокачественных опухолей меланома кожи занимает 2-е место после рака легкого. В России примерно 22 % пациентов с выявленной меланомой кожи на момент первичного обращения к онкологу имеют уже III–IV стадию опухолевого процесса.

На сегодняшний день выявлено множество причин возникновения меланомы кожи, большинство из которых – драйверные мутации в MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) сигнальном пути. К ним относятся перестройки в генах, кодирующих белки RAS, RAF, MEK1/2 и ERK1/2, наиболее часто встречаются мутации RAF и MEK1/2 [1]. Большинство мутантных белков служат мишенями для современной таргетной терапии. Однако не все пациенты с меланомой имеют данные мутации и, соответственно, мишени для таргетной терапии [2]. Для группы пациентов с отсутствием мишеней для используемой в настоящий момент таргетной терапии, низкой экспрессией рецепторов и прогностически неблагоприятным количественным и качественным составом лимфоидной инфильтрации для успешного применения ингибиторов иммунных контрольных точек [3, 4] необходим поиск иных подходов к лечению, в частности выявление новых точек приложения таргетной терапии.

Одной из таких точек является ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) – мутация, впервые исследованная в других опухолях (немелкоклеточный рак легкого, анапластическая лимфома) и выявляемая при первичной меланоме кожи в 2–8 % случаев [5]. ALK является рецепторной тирозинкиназой из семейства инсулинзависимых рецепторов, состоящей из 3 доменов: экстрацеллюлярного, трансмембранного и интрацеллюлярного [6]. Существует 3 изоформы мутантной ALK: ALK<sup>AT1</sup>, ALK wt, EML4–ALK, различающихся по механизму образования (альтернативный сплайсинг, транслокация соответственно) [7, 8]. Мутантная ALK содержит преимущественно интрацеллюлярный домен и обладает повышенной способностью к аутоактивации, что вызывает неконтролируемое деление клеток [9]. Данная мутация может встречаться как отдельно, так и в комбинации с другими мутациями: B-RAF, NRAS (NFI), GNA11, что прогностически неблагоприятно [10]. Этот феномен еще раз подтверждает необходимость опреде-

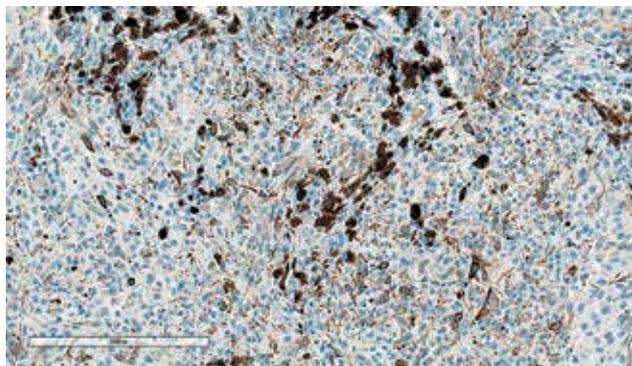
ления мутации ALK у ряда пациентов, так как ингибирование одной мутации из нескольких не дает должного результата, приводя к последующему прогрессированию болезни [11]. У пациентов с ALK-позитивной меланомой становится возможным применение ингибиторов ALK, эффективно используемых до этого при метастатическом немелкоклеточном раке легкого и анапластической лимфоме [12]. К данным препаратам относятся энсартиниб, церитиниб, кризотиниб, энтректиниб и TAE-684 [13, 14]. Новейшие исследования показали эффективность ингибиторов ALK при терапии EML4 – ALK позитивной меланомы кожи *in vitro* и *in vivo*. Запущено исследование эффективности данных препаратов при лечении ряда опухолей, в том числе меланомы NCT02097810. Изоформы ALK wt и ALK<sup>AT1</sup>, согласно результатам последних исследований, нечувствительны к ингибиторам ALK [15].

Актуальна в настоящее время и проблема дифференциальной диагностики первичной меланомы кожи, поэтому поиск новых маркеров меланомы также заслуживает внимания. Одним из возможных диагностических маркеров меланомы является Tumor associated protein-72 (TAG-72), активно изучающийся при таких онкологических заболеваниях, как рак яичника, рак желудка и рак легкого, и также претендующий на диагностическое и прогностическое значение при первичной меланоме кожи [16]. Очевидно, что выявление ALK и TAG-72 у пациентов с меланомой кожи в будущем может играть важную роль при выборе метода лечения, а также дифференциальной диагностики и прогнозирования исхода заболевания.

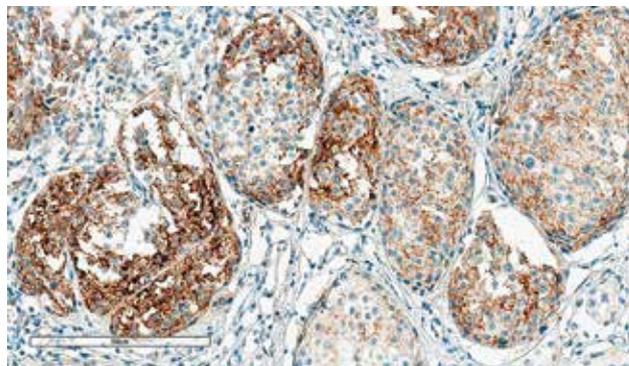
### Материалы и методы

В работе использовались парафиновые блоки с операционным материалом от 40 пациентов с первичной меланомой кожи, проходящих лечение в Московском клиническом научном центре с 20 июля 2015 г. по 26 сентября 2016 г. (мужчин – 15, женщин – 25) медиана возраста – 64 года.

В качестве методов исследования применялись гистологическое исследование, морфологический анализ, иммуногистохимическое исследование, статистическая обработка результатов. Оцениваемые признаки морфологического анализа: гистологический тип, толщина по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, изъязвление, степень выраженности лимфоидной инфильтрации, митотический индекс. Для рутинного гистологического исследования материал фиксировали 10 %-ным нейтральным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ экспрессии тирозинкиназы ALK и онкобелка TAG-72 проводился иммуногистохимическим методом на срезах, изготовленных с тех же



**Рис. 1.** Выраженная очаговая ядерно-цитоплазматическая положительная экспрессия ALK в клетках опухоли ( $\times 200$ ). Мутантный белок был окрашен моноклональными антителами D57.3



**Рис. 2.** Умеренная очаговая цитоплазматическая положительная экспрессия ALK в клетках опухоли ( $\times 200$ ). Мутантный белок был окрашен моноклональными антителами D57.3

блоков. Иммуногистохимическое исследование с моноклональными антителами D57.3 к ALK проводилось на иммуностейнере Ventana, с антителами B72.3 к TAG-72 – на Thermo Fischer. В качестве системы детекции использовали: Envision для TAG-72 и Ventana для ALK. Оценку статистической значимости результатов исследования выполняли путем вычисления коэффициента корреляции методом рангов.

### Результаты и обсуждение

ALK-мутация обнаружена в 7 (17,5 %) (рис. 1, 2), TAG-72 – в 4 (10 %) случаях (см. таблицу). Мы провели оценку коэффициента корреляции между наличием ALK и TAG-72, которая показала прямую среднюю силу связи (коэффициент корреляции составил 0,31). Также была выявлена прямая связь средней силы между наличием у пациента онкомаркера

*Характеристика морфологических параметров и степени выраженности лимфоидной инфильтрации у пациентов с обнаруженной экспрессией ALK и TAG-72*

| Возраст пациента, лет | Пол пациента | ALK | TAG-72 | Локализация                        | Кларк | Бреслоу | Митотический индекс | Лимфоцитарная инфильтрация опухоли | Изъязвление | Гистологический тип опухоли  |
|-----------------------|--------------|-----|--------|------------------------------------|-------|---------|---------------------|------------------------------------|-------------|--|
| 65                    | Ж            | +   | –      | Верхняя конечность и плечевой пояс | 3     | 1,1     | $<1/\text{мм}^2$    | Умеренная                          | Нет         | Узловая эпителиоидно-клеточная меланома                                    |
| 63                    | Ж            | +   | +      | Нижняя конечность                  | 4     | 5       | $>1/\text{мм}^2$    | Нет                                | Есть        | Узловая эпителиоидно-клеточная пигментная меланома                         |
| 65                    | М            | +   | +      | Корпус                             | 3     | 4       | $>1/\text{мм}^2$    | Выраженная                         | Есть        | Узловая эпителиоидно-клеточная пигментная меланома                         |
| 67                    | М            | +   | –      | Корпус                             | 4     | 4       | $>1/\text{мм}^2$    | Выраженная                         | Есть        | Узловая эпителиоидно-клеточная пигментная меланома                         |
| 48                    | Ж            | +   | –      | Корпус                             | 4     | 1       | $<1/\text{мм}^2$    | Выраженная                         | Есть        | Поверхностно распространяющаяся эпителиоидно-клеточная меланома            |
| 68                    | Ж            | +   | +      | Верхняя конечность и плечевой пояс | 2     | 1       | $<1/\text{мм}^2$    | Умеренная                          | Есть        | Поверхностно распространяющаяся эпителиоидно-клеточная пигментная меланома |
| 89                    | Ж            | +   | –      | Голова/шея                         | 5     | 6       | $>1/\text{мм}^2$    | Выраженная                         | Есть        | Узловая эпителиоидно-клеточная пигментная меланома                         |
| 33                    | М            | –   | +      | Голова/шея                         | 2     | 1       | $>1/\text{мм}^2$    | Выраженная                         | Есть        | Поверхностно распространяющаяся эпителиоидно-клеточная меланома            |

TAG-72, мутации ALK и изъязвлением — коэффициент корреляции составил 0,53 и 0,68 соответственно. Наблюдалась статистически значимая связь между наличием ALK и лимфоидной инфильтрации, которая в большинстве случаев была выраженной ( $p < 0,05$ ). Корреляция между наличием ALK, TAG-72 и другими морфологическими параметрами не выявлена.

### Заключение

Несмотря на наличие корреляции средней силы связи между рядом параметров, стоит отметить, что для более достоверных выводов необходимо дальнейшее исследование данной проблемы с увеличением когорты. Однако на данном этапе, сопоставляя наличие экспрессии ALK (17,5 %) и TAG-72 (10 %) и их одновременное обнаружение (7,5 %), можно

сделать вывод о том, что дальнейшие исследования по определению их диагностической ценности представляются перспективными. Наличие корреляционной связи средней силы между изъязвлением, с одной стороны, и наличие онкомаркера и мутантной киназы с другой, также говорит о потенциальной ценности данного явления для усовершенствования диагностики первичной меланомы кожи. Наличие выраженной лимфоидной инфильтрации у ALK-позитивных пациентов претендует на диагностическое значение при первичной меланоме кожи.

Наше исследование показывает перспективность определения ALK и TAG-72, поскольку в совокупности с дальнейшими исследованиями определение данных параметров может улучшить диагностику и лечение пациентов с первичной меланомой кожи.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Evans M.S., Madhunapantula S.V., Robertson G.P., Drabick J.J. Current and Future Trials of Targeted Therapies in Cutaneous Melanoma. *Adv Exp Med Biol* 2013;779:223–55. DOI: 10.1007/978-1-4614-6176-0\_10. PMID: 23288642.
- Dhomen N., Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(3):529–45. PMID: 19464601.
- Jazirehi A.R., Lim A., Dinh T. PD-1 inhibition and treatment of advanced melanoma—role of pembrolizumab. *Am J Cancer Res*. 2016;6(10):2117–28. PMID: 27822406.
- Titov K.S., Chikileva I.O., Kiselevskiy M.V., Kazakov A.M. Lymphoid infiltration, as a predictor of successful immunotherapy with melanoma. *Malignant Tumors* 2017;1:61–6. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-1-61-66.
- Yeh I. Recent advances in molecular genetics of melanoma progression: implications for diagnosis and treatment. Department of Dermatology, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA. 2016, Jun 28; 5. (F1000FacultyRev):1529. DOI: 10.12688/f1000research.8247.1 PMID: 27408703.
- Roskoski R.Jr. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in the treatment of ALK-driven lung cancers. *Pharmacol Res* 2017;117:343–56. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.01.007. PMID: 28077299.
- Montavon G., Jauquier N., Coulon A. et al. Wild-type ALK and activating ALK-R1275Q and ALK-F1174L mutations upregulate Myc and initiate tumor formation in murine neural crest progenitor cells. *Oncotarget* 2014;5:4452–66. PMID: 24947326. PMCID: PMC4147337.
- Takezawa K., Okamoto I., Nishio K. et al. Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2140–8. PMID: 21415216.
- Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011. PMID: 20602996.
- Busam K.J., Villain R.E., Lum T. et al. Primary and metastatic cutaneous melanomas express ALK through alternative transcriptional initiation. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(6):786–95. PMID: 26872010. PMCID: PMC5037961.
- Sosman J.A., Margolin K.A. Inside life of melanoma cell signaling, molecular insights, and therapeutic targets. *Curr Oncol Rep*. 2009;11(5):405–11. PMID: 19679016.
- Obenauf A.C., Zou Y., Ji A.L. et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 2015;520(7547):368–72. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14336>.
- Schulte J.H., Bachmann H.S., Brockmeyer B. et al. High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clin. Cancer Res* 2011;17:5082–92. PMID: 21632861.
- Cheng D.T., Mitchell T.N., Zehir A. et al. Memorial Sloan Kettering-integrated mutation profiling of actionable cancer targets (MSK-IMPACT): a hybridization capture-based next-generation sequencing clinical assay for solid tumor molecular oncology. *J. Mol. Diagn* 2015;17:251–64. PMID: 25801821.
- Couts K.L., Bemis J., Turner J.A. et al. ALK Inhibitor response in melanomas expressing eml4-alk fusions and alternate ALK isoforms. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(1):222–3. PMID: 29054983.
- Deo Y.M., Tibor K. Bispecific molecules directed to tumor associated glycoprotein-72 and fc receptor. 1997. Pub. No.:WO/1999/019362 International Application No.: PCT/us 1997/018428.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

А.М. Казаков / A.M. Kazakov: <https://orcid.org/0000-0002-9534-2729>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА «БАКТЕРИОСЕНС», ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.Б. Морозова<sup>1</sup>, Е.А. Плотникова<sup>1</sup>, А.Д. Плютинская<sup>1</sup>, В.О. Страмова<sup>1</sup>, М.С. Воронцова<sup>1</sup>, А.А. Панкратов<sup>1</sup>,  
Р.И. Якубовская<sup>1</sup>, Е.А. Макарова<sup>2</sup>, Е.А. Лукьянец<sup>2</sup>, А.Д. Каприн<sup>1</sup>

<sup>1</sup>МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;  
Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

<sup>2</sup>ФГУП «Государственный научный центр “НИОПИК”»; Россия, 123001 Москва, ул. Большая Садовая, 1, корп. 4

**Контакты:** Наталья Борисовна Морозова n.b.morozova@yandex.ru

**Введение.** Наиболее перспективными фотосенсибилизаторами, поглощающими в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, являются бактериохлорины. Их использование позволяет увеличить эффективность фотодинамической терапии за счет более глубокого проникновения излучения в опухоль.

**Цель исследования** – доклиническое изучение противоопухолевой фотоиндуцированной активности и биораспределения препарата «Бактериосенс».

**Материалы и методы.** «Бактериосенс» – препарат на основе мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, поглощающий при 747 нм. Фотоиндуцированную цитотоксичность *in vitro* изучали на опухолевых клетках человека – A549, Hep2, BT-474, MCF-7, SK-BR-3, PC3, EJ и мыши – S37, C26, LLC. Исследования *in vivo* проводили на мышах с опухолями S37, LLC, C26, большого и малого размера.

**Результаты.** В системе *in vitro* «Бактериосенс» при оптическом облучении приводил к эффективному подавлению роста опухолевых клеток в культуре (величина  $IC_{50}$  варьировала от 0,08 мкМ до 1,21 мкМ) и характеризовался отсутствием токсичности без воздействия света. Фотодинамическая терапия с «Бактериосенсом» у мышей с инокулированными опухолями (малого и большого размера) различного генеза, проведенная в эффективном режиме, приводила к регрессии первичного опухолевого узла на 90–100 % при отсутствии рецидива опухоли в течение 90 сут после лечения.

**Выводы.** «Бактериосенс» является перспективным препаратом для фотодинамической терапии опухолей малого и большого размера, может успешно использоваться в качестве альтернативного, органосохраняющего малоинвазивного метода лечения злокачественных новообразований, в том числе рака предстательной железы.

**Ключевые слова:** «Бактериосенс», фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, биораспределение, фотоиндуцированная противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-55-64

## PRECLINICAL TRIAL OF BACTERIOSENS USED FOR THE PHOTODYNAMIC THERAPY OF MALIGNANT TUMORS, INCLUDING PROSTATE CANCER

N.B. Morozova<sup>1</sup>, E.A. Plotnikova<sup>1</sup>, A.D. Plyutinskaya<sup>1</sup>, V.O. Stramova<sup>1</sup>, M.S. Vorontsova<sup>1</sup>, A.A. Pankratov<sup>1</sup>,  
R.I. Yakubovskaya<sup>1</sup>, E.A. Makarova<sup>2</sup>, E.A. Lukyanets<sup>2</sup>, A.D. Kaprin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Center of Radiology,  
Ministry of Health of Russia; 3, 2<sup>nd</sup> Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

<sup>2</sup>State scientific center “NIOPIK”; Bldg 4, 1 Bolshaya Sadovaya St., Moscow 123001, Russia

**Introduction.** Bacteriochlorins are the most promising photosensitizers absorbing in the near-infrared spectral region. Their use can enhance the efficiency of photodynamic therapy due to the deeper penetration of radiation into the tumor.

**Objective** to conduct a preclinical study of the photoinduced antitumor activity and biodistribution of Bacteriosens.

**Materials and methods.** Bacteriosens is a preparation based on meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin absorbing at 747 nm. Photoinduced cytotoxicity was investigated *in vitro* using human tumor cells: A549, Hep 2, BT-474, MCF-7, SK-BR-3, PC3, and EJ and murine tumor cells: S37, C26, and LLC. *In vivo* studies were performed in mice with large and small tumors (S37, LLC, and C26).

**Results.** *In vitro* investigation show that bacteriosens during optical irradiation led to the effective suppression of tumor cell growth in culture (the  $IC_{50}$  value varied from 0,08  $\mu$ M to 1,21  $\mu$ M) and had no toxicity without exposure to light. The effective photodynamic

therapy regimen using Bacteriosens in mice with inoculated small and large tumors of different genesis resulted in regression of a primary tumor node on 90–100 % of the animals in the absence of tumor recurrence within 90 days after treatment.

**Conclusion.** Bacteriosens is a promising agent for the photodynamic therapy of small and large tumors; it can be successfully used as an alternative, organ-sparing minimally invasive treatment for malignant tumors, including prostate cancer.

**Keywords:** Bacteriosens, photodynamic therapy, photosensitizer, biodistribution, photoinduced antitumor activity

### Введение

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями мужского населения России в 2016 г. рак предстательной железы (РПЖ) занимает 2-е место (14 %) после рака легких (17,6 %). Смертность от данного заболевания в 2016 г. в России составила 7,9 % [1]. Высокий уровень заболеваемости РПЖ является общемировой тенденцией.

Основные способы лечения РПЖ – хирургический метод, химиотерапия, гормональная, лучевая терапия, а также комбинированное лечение [2–6]. У каждого из них есть достоинства, недостатки и ограничения. Одна из наиболее сложных проблем – реабилитация онкологических больных после проведенного радикального лечения. В настоящее время среди возможных вариантов лечения локализованного рака предстательной железы все большее значение приобретают малоинвазивные методики локальной терапии, такие как ультразвуковая и радиочастотная абляция, брахитерапия, криотерапия и фотодинамическая терапия (ФДТ) [7–9].

В последние десятилетия ФДТ показала свою перспективность при лечении опухолей различных локализаций, в том числе РПЖ. Основными преимуществами ФДТ перед общепринятыми методами лечения злокачественных новообразований являются избирательность, отсутствие риска хирургического вмешательства и тяжелых системных осложнений, допустимость многократного повторения, сочетание в одной процедуре флуоресцентной диагностики и лечебного воздействия, низкая стоимость лечения [10].

Фотодинамическая терапия – методика лечения рака, основанная на взаимодействии света, фотосенсибилизатора (ФС) и кислорода. При возбуждении ФС светом определенной длины волны, соответствующей максимуму его поглощения, в ткани при наличии кислорода образуются радикалы, которые обладают большой химической активностью и инициируют свободнорадикальные реакции, приводящие к гибели опухолевых клеток и ткани [10–12].

Фотодинамическая терапия может применяться как малоинвазивная терапия при лечении РПЖ с использованием различных ФС, находящихся на разных стадиях клинических испытаний: «Фоскан» (mTHPC) с длиной волны возбуждения 652 нм, TOOKAD (WST09 и WST11) – 763 нм, MOTEXAFIN LUTETIUM (MLu) – 732 нм, аминоклевулиновая кислота (5-ALA) (как пролекарство – предшествен-

ник протопорфирина IX) и «Фотифрин» – 630 нм, Визудин (Вертепорфин) – 689 нм, производные фталоцианина – 670–690 нм [9, 13, 14].

Успешное применение метода ФДТ для лечения злокачественных новообразований, в том числе РПЖ, стимулирует поиск новых ФС с поглощением в длинноволновой области спектра. Наиболее перспективными для ФДТ являются ФС с максимумом поглощения в дальнем красном и ближнем инфракрасном диапазонах (700–850 нм), так называемом «терапевтическом окне», где собственное поглощение биологической ткани минимально. Это обеспечивает возможность более глубокого проникновения излучения в ткань и, как следствие, высокую эффективность противоопухолевой терапии [14–17].

Наиболее перспективными ФС для ФДТ, поглощающими в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, являются бактериохлорины. Использование бактериохлоринов, имеющих интенсивное поглощение в интервале 720–800 нм, позволяет увеличить эффективность ФДТ за счет более глубокого проникновения излучения в опухоль. Однако многие из них имеют ограниченное применение из-за низкой химической стабильности, фотостабильности и высокой гидрофобности, что требует поиска транспортных систем, эффективно доставляющих ФС к опухолевой ткани [9, 13]. Целью данного исследования стало изучение специфической фотоиндуцированной активности нового препарата «Бактериосенс» (на основе синтетического производного бактериохлорина) в системе *in vitro* и *in vivo* с использованием опухолевых моделей различного гистогенеза и РПЖ.

### Материалы и методы

#### Фотосенсибилизатор

Препарат «Бактериосенс» – лиофилизат для приготовления раствора для инфузий производства ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»» (Россия). Активный компонент (мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин) [18]. В качестве растворителя используется 0,025 % раствор гидрокарбоната натрия ( $\text{NaHCO}_3$ ) –  $\lambda_{\text{max}} = 747$  нм. Для исследований *in vitro* и *in vivo* раствор препарата готовили *ex tempore*.

#### Исследования *in vitro*

Изучение фотоиндуцированной активности препарата «Бактериосенс» проводили на опухолевых клетках человека эпителиального происхождения

(предстательной железы: аденокарцинома (PC3), карцинома (LnCap4); легкого: карцинома (A549); гортаноглотки: эпидермоидная карцинома (Hep2); молочной железы: карцинома (BT-474); аденокарцинома (MCF-7), аденокарцинома (SK-BR-3); мочевого пузыря: карцинома (EJ); толстой кишки: карцинома (HT-29)) и опухолевых клетках мышцы различного генеза (саркомы мягких тканей (S37), аденокарциномы толстой кишки (C26), карциномы легкого Льюис (LLC)), адаптированных нами для роста в культуре *in vitro*.

Культивирование опухолевых клеток *in vitro* проводилось согласно рекомендациям, указанным в сертификате культуры клеток с использованием соответствующих сред с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) [19, 20]. Пассирование клеток проводилось при 37 °С во влажной атмосфере с содержанием 5 % CO<sub>2</sub> (стандартные условия).

#### Методика проведения фотодинамического воздействия на опухолевые клетки

Для оценки фотоиндуцированной активности «Бактериосенса» клетки рассеивались в 96-луночные культуральные планшеты, инкубировались в течение 28 ч в стандартных условиях. Посевная концентрация клеток устанавливалась для каждой культуры с таким расчетом, чтобы воздействие проходило в экспоненциальной (логарифмической) фазе роста клеток. Далее в планшеты вносился ФС при варьировании концентрации от 0,002 до 2,4 мкМ (в триплетах) и проводилось облучение галогеновой лампой с использованием широкополосного фильтра КС-19 ( $\lambda \geq 720$  нм). Плотность мощности составляла  $21,0 \pm 1,0$  мВт/см<sup>2</sup>, а световая доза – 10 Дж/см<sup>2</sup>. Выбранный

временной интервал инкубации – 30 мин, 1, 2, 4 и 6 ч. Облучение проводили в 2 модификациях: с удалением препарата из среды инкубации и без удаления ФС. После воздействия светом клетки инкубировались в стандартных условиях 24–28 ч. Оценка выживаемости клеток проводилась визуально и колориметрическим методом с использованием МТТ-теста [21]. Критериями оценки цитотоксического эффекта являлись величины ИК<sub>50</sub> и ИК<sub>90</sub>, т. е. концентрации лекарственного средства, вызывающие торможение роста клеток на 50 и 90 %.

#### Исследования *in vivo*

**Животные.** Исследования проводили на мышах в возрасте 7–10 нед (табл. 1).

Животные находились на стандартной сбалансированной диете с использованием экструдированного комбикорма для содержания мелких лабораторных грызунов SPF категории «ЧАРА» компании ЗАО «Ассортимент-Агро» и водопроводной воды, фильтрованной путем системы обратного осмоса OsmoStreamCompact OD 200.

Исследования были одобрены комиссией по биоэтике и проведены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с национальными стандартами. Опухолевый материал прививали мышам подкожно с внешней стороны бедра (при необходимости предварительно удаляли шерстный покров с помощью крема-депилятора).

**Изучение биораспределения и флуоресцентной контрастности.** Оценку распределения «Бактериосенса» в опухолевой (S37, LLC, C26, Ca755, PC3) и окружающей ткани (кожа) проводили по уровню нормированной флуоресценции, отражающей накопление

Таблица 1. Характеристика опухолевых моделей и используемых животных

| Опухолевая модель (аббревиатура)                    | Мыши   |       | Источник получения животных  | Содержание животных      |
|---|--|-------|--|--------------------------|
|   | линия  | пол   |  |                          |
| <b>Перевивные опухоли</b>                           |  |       |  |                          |
| Саркома мягких тканей (S37)                         | Гибриды 1-го поколения F <sub>1</sub> (CBA × C57Bl/6J) | Самки | Научный центр биомедицинских технологий РАМН (филиал НЦБТ «Андреевка») | Конвенциональные условия |
| Карцинома легкого Льюис (LLC)                       | C57Bl/6J   | Самки | НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино)                 | SPF                      |
| Аденокарцинома молочной железы (Ca755)              |  |       |  |                          |
| <b>Клеточные линии</b>                              |  |       |  |                          |
| Аденокарцинома толстой кишки мыши (C26)             | BALB/c   | Самки | Научный центр биомедицинских технологий РАМН (филиал НЦБТ «Андреевка») | Конвенциональные условия |
| Аденокарцинома предстательной железы человека (PC3) | BALB/c Nude (nu/nu)                                    | Самцы | НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино)                 | SPF                      |

фотоактивной формы препарата, методом локальной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) *ex vivo*, на лазерной установке для флуоресцентной диагностики и контроля ФДТ «ЛЭСА 6» («БИОСПЕК», Россия). Препарат вводили внутривенно в дозах 1, 2,5 и 6,25 мг/кг. Через различные интервалы времени (5 мин – 24 ч) после введения ФС мышей умерщвляли дислокацией шейных позвонков, извлекали опухолевый узел, окружающую кожу и *ex vivo* регистрировали флуоресценцию в спектральном диапазоне 640–850 нм.

Интегральную интенсивность флуоресценции, соответствующую максимуму флуоресценции «Бактериосенса» ( $\lambda_{\text{max}} = 747$  нм), полученную при анализе образцов ткани, нормировали на интегральную интенсивность сигнала обратного диффузного рассеяния возбуждающего лазерного излучения (633 нм) и таким образом определяли нормированную флуоресценцию (ФН) в тканях. Величину флуоресцентной контрастности (ФК) рассчитывали как отношение средней величины ФН в опухоли к средней величине ФН в коже.

**Изучение фотоиндуцированной противоопухолевой активности.** Эффективность противоопухолевого действия ФДТ с «Бактериосенсом» оценивали у мышей с опухолями малого размера  $130 \pm 30$  мм<sup>3</sup> (S37) – 6–7-й день роста опухоли, среднего размера  $230 \pm 30$  мм<sup>3</sup> (PC3) – 9–10-й день роста опухоли и большого размера  $400 \pm 40$  мм<sup>3</sup> (S37, LLC, C26, Ca755) – 12–14-й день роста опухоли. В качестве анестезии применяли дроперидол (2,5 мг/мл) внутривенно за 10–15 мин до сеанса ФДТ. Для облучения использовали светодиодный источник излучения с  $\lambda = 752 \pm 14$  нм (экспериментальный образец, разработанный в ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»», с регулятором плотности мощности светового излучения 30–150 мВт/см<sup>2</sup>).

С целью отработки эффективных режимов проведения ФДТ с «Бактериосенсом» варьировали дозу препарата (0,5–7,5 мг/кг), интервал времени между его введением и облучением (5 мин – 24 ч), дозу света (60–180 Дж/см<sup>2</sup>) у мышей с саркомой S37. При лечении опухолей большого размера (S37, LLC, C26, Ca755) варьировали количество полей облучения (одно- и полипозиционный режимы, суммарная световая доза 270 Дж/см<sup>2</sup>).

Эффективность ФДТ оценивали по общепринятым в экспериментальной онкологии критериям в процентах: торможению роста опухоли (ТРО), увеличению продолжительности жизни (УПЖ) и критерию излеченности (КИ) животных [21]. Биологически значимым терапевтическим эффектом считали ТРО  $\geq 70$  %, УПЖ 50 %, КИ  $\geq 25$  %. Для статистической оценки различий между группами применяли U-критерий Манна–Уитни, расчеты проводили с использованием программы Primer of Biostatistics

версии 4.03. Отличия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

### Исследования *in vitro*

В биологических тестах *in vitro* установлено, что препарат «Бактериосенс» в диапазоне концентраций от 0,002 до 2,4 мкМ не обладал темновой цитотоксичностью относительно культур опухолевых клеток человека PC3, LnCap4, A549, HEP2, BT-474, MCF-7, SK-BR-3, EJ и HT-29 и мыши S-37, C26 и LLC (табл. 2). При воздействии светом препарат проявлял высокую специфическую активность в системе *in vitro* (величина ИК<sub>50</sub> при оптимальном времени инкубации, варьировала от 0,08 до 1,21 мкМ в зависимости от культуры клеток).

Показано, что максимальная фотоиндуцированная активность «Бактериосенса» для культуры S37 отмечена при 4 ч инкубации до воздействия, для всех остальных клеточных линий максимальный эффект при фотодинамическом воздействии достигался при 2-часовом инкубировании, и с увеличением времени до 6 ч разница в значении величины ИК<sub>50</sub> была статистически незначимой. Данные опытов с удалением препарата из среды культивирования косвенно свидетельствуют о том, что «Бактериосенс» эффективно

**Таблица 2.** Фотоиндуцированная активность препарата «Бактериосенс» (ИК<sub>50</sub>, мкМ) относительно опухолевых клеток человека и мыши (при оптимальном времени инкубации до воздействия)

| Клеточная линия                            | ИК <sub>50</sub> , мкМ                                      |  |
|--|---|--|
|  | облучение при наличии фотосенсибилизатора в среде инкубации | облучение с удалением фотосенсибилизатора из среды инкубации |
| <b>Культуры опухолевых клеток человека</b> |   |  |
| PC3  | 0,28 ± 0,01   | 0,38 ± 0,02  |
| LnCap4                                     | 0,29 ± 0,02   | 0,37 ± 0,01  |
| A549                                       | 0,32 ± 0,02   | 0,47 ± 0,01  |
| HEP2                                       | 0,24 ± 0,01   | 0,26 ± 0,02  |
| BT-474                                     | 0,30 ± 0,02   | 0,52 ± 0,02  |
| MCF-7                                      | 0,31 ± 0,01   | 1,21 ± 0,02  |
| SK-BR-3                                    | 0,22 ± 0,02   | 0,23 ± 0,02  |
| EJ   | 0,25 ± 0,02   | 0,26 ± 0,02  |
| HT-29                                      | 0,39 ± 0,01   | 0,91 ± 0,03  |
| <b>Культуры опухолевых клеток мыши</b>     |   |  |
| S37  | 0,08 ± 0,01   | 0,13 ± 0,01  |
| C26  | 0,08 ± 0,01   | 0,13 ± 0,01  |
| LLC  | 0,12 ± 0,01   | 0,32 ± 0,01  |

проникает в опухолевые клетки и накапливается в них в течение определенного временного интервала, при этом накопление препарата в клетках культур MCF-7, HT-29 и LLC было менее выражено.

Таким образом, изучение специфической активности препарата «Бактериосенс» в системе *in vitro* показало его высокую фотоиндуцированную активность относительно опухолевых клеток различного генеза, в частности клеток предстательной железы (PC-3, LNCaP), при отсутствии темновой токсичности и эффективном проникновении внутрь клеток как человека, так и мыши.

### Исследования *in vivo*

**Изучение распределения препарата «Бактериосенс» у мышей с опухолями различного генеза.** Распределение препарата в опухоли (S37, LLC, C26, Ca755, PC3) и окружающей коже оценивали методом ЛФС в интервале от 5 мин до 24 ч по нормированной флуоресценции «Бактериосенса», отражающей уровень его накопления в тканях животных.

Показано, что «Бактериосенс» дозозависимо накапливался в опухолевой и окружающей ткани (кожа) независимо от используемых опухолевых моделей. Нормированная флуоресценция препарата мгновенно регистрировалась в опухолевой ткани, достигая высоких значений уже через 30 мин после введения, и сохранялась на максимальном уровне до 4 ч. На рисунке представлены ФН и ФК «Бактериосенса» в дозе 2,5 мг/кг (терапевтическая доза (ТД)).

Максимальные значения ФН в опухолевой ткани для препарата в ТД 2,5 мг/кг регистрировались в интервале от 0,5 до 4 ч и составляли 5,4–10,4 у. е. С увеличением дозы препарата уровень ФН как в опухолях, так и окружающей ткани увеличивался. Максимальный уровень ФН ФС в окружающей коже у мышей с опухолями регистрировался через 2–4 ч после введения и составлял 2,3–3,9 у. е.

Экспериментальные данные по максимальной нормированной флуоресценции в опухолях и флуоресцентной контрастности относительно кожи представлены в табл. 3.

Биораспределение препарата «Бактериосенс» в опухолях различного гистогенеза имеют схожие характеристики. Значения максимальной нормированной флуоресценции препарата в опухолях LLC, S37, C26, Ca755 и PC3 независимо от дозы регистрировались на ранние сроки после введения – через 0,5–4 ч. Причем наиболее высокий уровень ФН регистрировался в аденокарциноме предстательной железы PC3 на всех сроках наблюдения.

Для всех исследованных опухолей максимальная ФК относительно кожи регистрировалась через 5–60 мин после введения препарата независимо от его дозы и варьировала от 1,9 до 4,5 у. е.

Таким образом, исследования, проведенные с «Бактериосенсом», показали, что препарат мгновенно накапливался в тканях опухолей LLC, S37, C26, Ca755 и PC3, достигая максимальных значений уже через 30 мин после введения, и сохранялся до 4 ч. С увеличением дозы препарата нормированная флуоресценция в опухолевой ткани увеличивалась. Максимальная флуоресцентная контрастность относительно кожи регистрировалась через 5–60 мин после введения. В связи с этим при ФДТ рекомендуется проводить облучение на ранние сроки после введения препарата (0,5–4 ч).

**Определение оптимального терапевтического режима ФДТ.** Поскольку эффективность ФДТ зависит от ряда параметров, оценку оптимального терапевтического режима ФДТ проводили у мышей с опухолью S37 (как наиболее экономичной и доступной модели) малого размера ( $130 \pm 30 \text{ мм}^3$ ) в зависимости от дозы «Бактериосенса» (0,5–7,5 мг/кг); при облучении как в период накопления ФС в опухолевой ткани – через 15–30 мин после введения препарата, так и через 2 ч – в период полувыведения ФС; в зависимости от дозы света (90–270 Дж/см<sup>2</sup>) и количества полей облучения (1–3 поля) опухолей большого

Таблица 3. Сравнительная оценка биораспределения препарата «Бактериосенс» в опухолях различного генеза

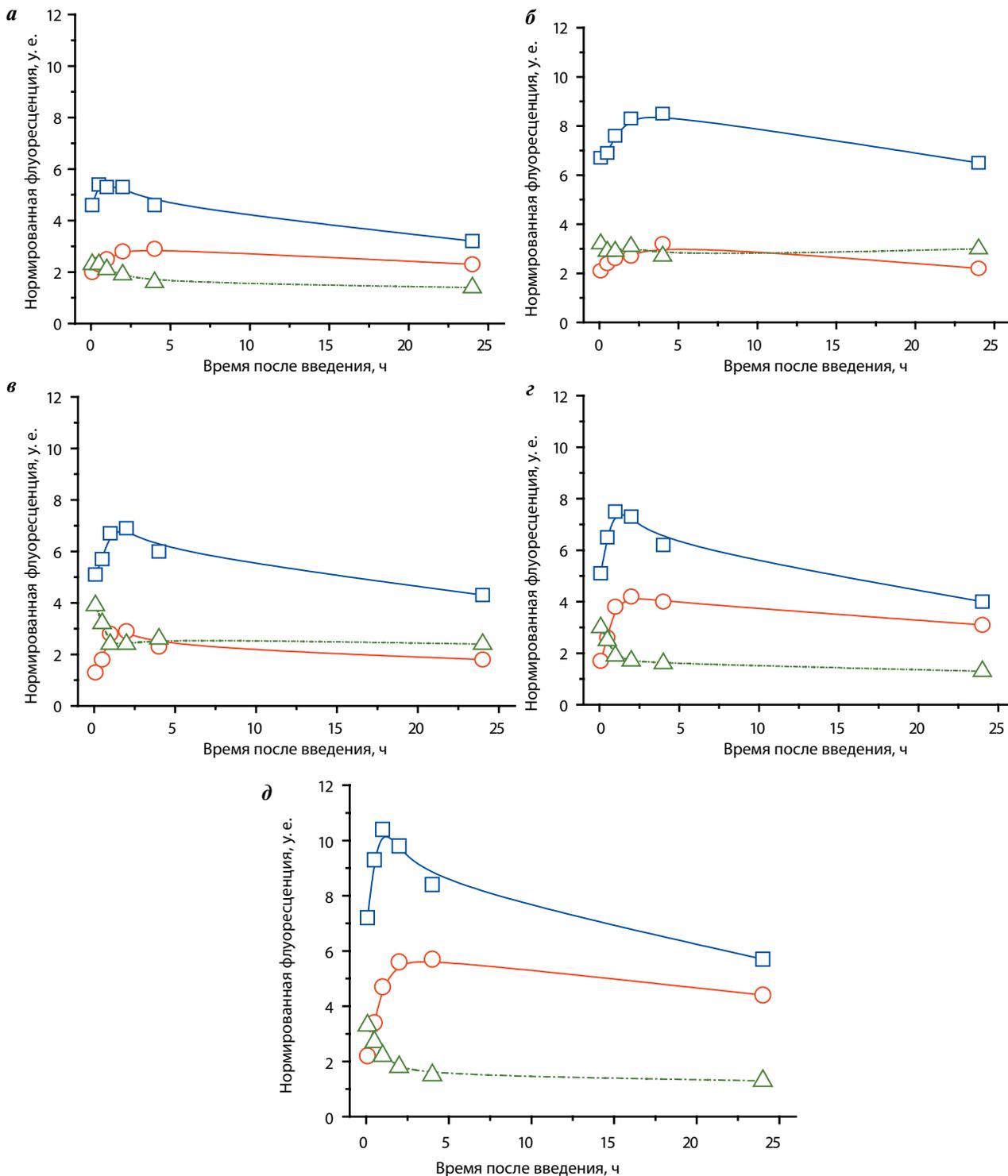
| Опухолевая модель | Доза препарата, мг/кг      | Максимальная нормированная флуоресценция в опухоли, у. е., через 0,5–4 ч | Максимальная флуоресцентная контрастность, опухоль/кожа, у. е., через 5–60 мин |
|-------------------|----------------------------|--|--|
| LLC               | 1,0                        | 5,4–6,6  | 2,7–3,1  |
| S37               |                            | 3,6–4,0  | 2,1–2,8  |
| C26               |                            | 3,9–5,2  | 2,3–3,1  |
| Ca755             |                            | 5,0–6,2  | 2,5–3,1  |
| PC3               |                            | 6,2–7,3  | 2,6–3,0  |
| LLC               | 2,5 (терапевтическая доза) | 6,9–8,5  | 2,9–3,2  |
| S37               |                            | 4,6–5,4  | 2,1–2,3  |
| C26               |                            | 5,7–6,9  | 3,2–3,9  |
| Ca755             |                            | 7,2–8,5  | 1,9–3,0  |
| PC3               |                            | 8,4–10,4   | 2,2–3,3  |
| LLC               | 6,25                       | 10,6–12,2  | 2,7–3,9  |
| S37               |                            | 7,7–9,5  | 2,5–3,1  |
| C26               |                            | 7,2–9,0  | 2,6–4,5  |
| Ca755             |                            | 8,0–10,6   | 2,7–2,9  |
| PC3               |                            | 9,3–13,0   | 2,6–3,4  |

*Примечание.* Данные представлены с учетом фоновых значений нормированной флуоресценции в опухоли.

размера ( $400 \pm 40 \text{ мм}^3$ ). Результаты исследований представлены в табл. 4, 5.

Через 2 ч после проведенного облучения у животных в зоне роста опухоли начинал развиваться отек, который сохранялся от 3 до 7 сут в зависимости от использованных режимов проведения ФДТ.

Фотоиндуцированная противоопухолевая активность «Бактериосенса» при облучении через 30 мин после его введения и фиксированной плотности энергии  $150 \text{ Дж/см}^2$  с увеличением дозы от 0,5 до 7,5 мг/кг возрастала; ТРО составляло 13–66 % (0,5 мг/кг), 69–97 % (1,0 мг/кг) и 100 % (2,5; 5,0 и 7,5 мг/кг).



Нормированная флуоресценция в опухолевой ткани (□), в коже (○) и флуоресцентная контрастность  $\Phi К = \Phi Н_{опухоль} / \Phi Н_{кожа}$  (Δ) «Бактериосенса» в терапевтической дозе 2,5 мг/кг у мышей с опухолями различного генеза: S37 (а), LLC (б), C26 (в), Ca755 (г), PC3 (д)

**Таблица 4.** Фотоиндуцированная противоопухолевая активность «Бактериосенса» у мышей с саркомой S37 малого размера в зависимости от интервала между введением препарата и облучением, дозы препарата и плотности энергии

| Режим фотодинамической терапии |             |                                       | Торможение роста опухоли, %, после фотодинамической терапии, сут |     |     |     |     | Увеличение продолжительности жизни*, % | Критерий излеченности*, % | Гибель от фототоксичности**, % |
|--------------------------------|-------------|---------------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|--|---------------------------|--------------------------------|
| Доза, мг/кг                    | Интервал Δt | Плотность энергии, Дж/см <sup>2</sup> | 9  | 12  | 14  | 16  | 19  |  |                           |                                |
| 0,5                            | 30 мин      | 150                                   | 66   | 21  | 19  | 13  | 23  | 6                                      | 0                         | 0                              |
| 1,0                            |             |                                       | 97   | 77  | 73  | 69  | 73  | 63                                     | 50                        | 0                              |
| 2,5                            |             |                                       | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | >100                                   | 75                        | 25                             |
| 5,0                            |             |                                       | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | >100                                   | 63                        | 37                             |
| 7,5                            |             |                                       | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | >100                                   | 25                        | 75                             |
| 2,5                            | 5 мин       |                                       | Гибель от фототоксичности  |     |     |     |     | 0                                      | 0                         | 100                            |
|                                | 30 мин      |                                       | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | >100                                   | 75                        | 25                             |
|                                | 2 ч         |                                       | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | >100                                   | 100                       | 0                              |
|                                | 4 ч         |                                       | 62   | 53  | 49  | 56  | 41  | 34                                     | 0                         | 0                              |
|                                | 24 ч        |                                       | 31   | 24  | 21  | 19  | 15  | 13                                     | 0                         | 0                              |
|                                | 30 мин      | 60                                    | 91   | 87  | 84  | 83  | 80  | 52                                     | 63                        | 0                              |
|                                |             | 90                                    | 100  | 98  | 92  | 91  | 84  | 59                                     | 63                        | 0                              |
|                                |             | 120                                   | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | >100                                   | 100                       | 0                              |
|                                |             | 150                                   | 100  | 100 | 100 | 99  | 99  | 61                                     | 75                        | 0                              |
|                                |             | 180                                   | 92   | 80  | 77  | 76  | 74  | 62                                     | 50                        | 0                              |

**Примечание.** Светодиодный источник оптического излучения  $752 \pm 14$  нм. \*Оценены в течение 75 сут после фотодинамической терапии; \*\*В течение 1–3 сут после фотодинамической терапии.

**Таблица 5.** Фотоиндуцированная противоопухолевая активность бактериосенса в терапевтической дозе 2,5 мг/кг у мышей с саркомой S37 большого размера в зависимости от количества полей облучения

| Режим фотодинамической терапии                  |                            |             | Торможение роста опухоли, %, после фотодинамической терапии, сут |     |     |     |     | Увеличение продолжительности жизни*, % | Критерий излеченности*, % |
|---|----------------------------|-------------|--|-----|-----|-----|-----|--|---------------------------|
| суммарная плотность энергии, Дж/см <sup>2</sup> | количество полей облучения | интервал Δt | 9  | 12  | 14  | 16  | 19  |  |                           |
| 270   | 3                          | 15 мин      | 100  | 100 | 99  | 97  | 96  | 64                                     | 38                        |
|   |                            | 30 мин      | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | 43                                     | 38                        |
|   |                            | 1 ч         | 97   | 88  | 87  | 87  | 77  | 43                                     | 25                        |
|   | 1                          | 30 мин      | 100  | 100 | 99  | 99  | 99  | 47                                     | 25                        |

**Примечание.** Светодиодный источник оптического излучения  $752 \pm 14$  нм. \*Оценены в течение 75 сут после фотодинамической терапии.

Наиболее высокий процент излеченных животных регистрировался при использовании дозы 2,5 мг/кг, однако при использовании высоких доз препарата (2,5–7,5 мг/кг) наблюдалась гибель части животных от фототоксического шока в течение 2 сут после сеанса ФДТ.

Увеличение интервала времени между введением «Бактериосенса» (2,5 мг/кг) и облучением (150 Дж/см<sup>2</sup>) до 2 ч приводило к 100 % излеченности животных группы при отсутствии гибели от фототоксичности на ранних сроках после лечения. Дальнейшее увеличе-

ние интервала до 4 и 24 ч приводило к резкому снижению эффективности: ТРО составляло 41–62 и 15–31 % соответственно; УПЖ мышей не достигало биологически значимого уровня, излеченность животных составляла 0 %.

Оценка противоопухолевой активности с учетом доз света показала, что при всех используемых значениях плотности энергии (60–180 Дж/см<sup>2</sup>) выявлена высокая противоопухолевая эффективность фотодинамического воздействия: ТРО составило 74–100 %, УПЖ – от 52 % до >100 %, излеченность

**Таблица 6.** Сравнительная оценка противоопухолевой эффективности препарата «Бактериосенс» у мышей с опухолями большого размера различного генеза при использовании оптимальных режимов проведения фотодинамической терапии

| Опухолевая модель | Размеры опухоли, мм <sup>3</sup> | Оптимальный режим проведения фотодинамической терапии |  |  | Противоопухолевая эффективность при оптимальных режимах проведения фотодинамической терапии |                                       |                          |
|-------------------|----------------------------------|---|--|--|---|---------------------------------------|--------------------------|
|                   |                                  | доза, мг/кг   | интервал между введением и облучением, мин | плотность энергии, Дж/см <sup>2</sup> (доза света) | торможение роста опухоли, %   | увеличение продолжительности жизни, % | критерий излеченности, % |
| S37               | 344 ± 78                         | 2,5   | 30   | 90 × 3 = 270                                       | 100   | 78                                    | 38*                      |
| LLC               | 414 ± 68                         | 2,5   | 30   | 90 × 3 = 270                                       | 99–100  | 51                                    | 25*                      |
| C26               | 398 ± 40                         | 2,5   | 30   | 90 × 3 = 270                                       | 100   | 54                                    | 0*                       |
| Ca755             | 430 ± 67                         | 2,5   | 30   | 90 × 3 = 270                                       | 90–100  | 88                                    | 38*                      |
| PC3               | 223 ± 35                         | 1,0   | 30   | 90 × 3 = 270                                       | 100   | –                                     | 100*                     |

**Примечание.** Источник излучения – светодиод с  $\lambda_{max} = 752 \pm 14$  нм. Плотность мощности 135 мВт/см<sup>2</sup>. \*Срок наблюдения за животными 75 сут.

составила 50–100 %. Наиболее высокий противоопухолевый эффект был получен при использовании световых доз 120 и 150 Дж/см<sup>2</sup>.

Таким образом, терапевтическими режимами проведения ФДТ с препаратом «Бактериосенс» при лечении опухолей малого размера являются: дозы препарата 1,0–2,5 мг/кг, интервалы после введения 0,5–2 ч и дозы света 120–150 Дж/см<sup>2</sup>.

При лечении опухолей большого размера облучение проводили полипозиционно 3 перекрывающимися полями. Световая доза каждого поля облучения составляла 90 Дж/см<sup>2</sup>, суммарная – 270 Дж/см<sup>2</sup>. «Бактериосенс» вводили в дозе 2,5 мг/кг (табл. 5).

При облучении через все исследованные интервалы времени после введения препарата выявлен высокий противоопухолевый эффект: ТРО составило 77–100 %, УПЖ – 43–64 %, КИ – 25–38 %, однако при использовании наиболее короткого интервала (15 мин) у 75 % животных наблюдался обширный некроз мышечной ткани, находящейся в зоне облучения.

Таким образом, оптимальными терапевтическими режимами проведения ФДТ с препаратом «Бактериосенс» при лечении опухолей большого размера являются: доза препарата 2,5 мг/кг, интервалы после введения 0,5–1 ч и доза света одного поля облучения 90 Дж/см<sup>2</sup>, суммарная – 270 Дж/см<sup>2</sup>.

**Определение спектра фотоиндуцированной противоопухолевой активности «Бактериосенса» при проведении фотодинамической терапии у мышей с опухолями различного гистогенеза.** Спектр противоопухолевой активности ФДТ с «Бактериосенсом» оценен при оптимальных режимах проведения ФДТ: доза препарата 2,5 мг/кг, интервал после его введения – 30 мин, плотность энергии 270 Дж/см<sup>2</sup> при трехпозиционном режиме облучения по 90 Дж/см<sup>2</sup>. Исследования проводили на перевивных моделях опухолей большого размера у иммунокомпетентных мышей с LLC, C26,

Ca755 и у иммунодефицитных мышей линии BALB/c Nude с ксенографтами опухоли предстательной железы PC3. Результаты исследований представлены в табл. 6.

В течение 2 ч после сеанса ФДТ у животных начинал развиваться отек, который к 24 ч достигал максимальных размеров и сохранялся до 5 сут. После облучения мыши не погибали.

При лечении опухолей большого размера наиболее высокий противоопухолевый эффект выявлен у мышей с аденокарциномой предстательной железы PC3, наименее выраженный – у мышей с аденокарциномой толстой кишки C26, в 100 % метастазирующей в легкие. Следует отметить, что у иммунодефицитных мышей с опухолью PC3 ФДТ можно проводить в более щадящем режиме путем уменьшения дозы препарата и плотности энергии, сохраняя при этом высокий противоопухолевый эффект. Противоопухолевая эффективность ФДТ увеличивается в ряду моделей C26 < LLC < S37 ≤ Ca755 < PC3.

### Заключение

Препарат «Бактериосенс» проявлял высокую фотоиндуцированную активность относительно опухолевых клеток человека эпителиального происхождения (PC3, LnCap4, A549, Hep2, BT-474, MCF-7, SK-BV-3, EJ, HT-29) и мыши различного генеза (S37, C26, LLC), характеризовался отсутствием темновой токсичности и эффективным проникновением в клетки. Величина ИК<sub>50</sub> при оптимальном времени инкубации варьировала от 0,08 до 1,21 мкМ.

Препарат в максимальной терапевтической дозе 2,5 мг/кг быстро (в течение 30 мин) поступал, накапливался в опухолевой ткани S37, Colo26, LLC, PC3 и сохранялся на высоком уровне (5,4–10,4 у. е.) до 4 ч. Максимальная флуоресцентная контрастность относительно кожи регистрировалась через 5–60 мин после введения и составляла 1,9–3,9 у. е.

Определены терапевтические режимы проведения ФДТ с «Бактериосенсом»: доза 1,0–2,5 мг/кг, интервал между введением и облучением 0,5–2 ч, плотность энергии 120–150 Дж/см<sup>2</sup> при лечении опухолей малого размера и  $90 \times 3 = 270$  Дж/см<sup>2</sup> при трехпозиционном облучении опухолей большого размера.

Использование оптимальных режимов проведения ФДТ с «Бактериосенсом» позволило добиться 100 % ТРО большого и малого размера; 100 и 38 % излеченности иммунокомпетентных мышей с опухолями малого и большого размеров соответственно.

У иммунодефицитных мышей с ксенографтами карциномы предстательной железы РС3, ФДТ с «Бактериосенсом» можно проводить в более щадящем режиме: доза препарата 1,0 мг/кг, плотность энергии 90 Дж/см<sup>2</sup> при сохранении высокого противоопухолевого эффекта – 100 % излеченности животных.

«Бактериосенс» является перспективным препаратом для ФДТ опухолей как малого, так и большого размера и может успешно использоваться в качестве альтернативного, органосохраняющего малоинвазивного метода лечения РПЖ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2016 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia, 2018, 250 p. (In Russ.)].
2. Моисеенко Т.Н., Говоров А.В., Прокопович М.А., Пушкарь Д.Ю. Современные представления о радикальном лечении локализованного рака простаты с использованием робот-ассистированной хирургии. Туберкулез и социально значимые заболевания 2014;3:66–71. [Moiseenko T.N., Govorov A.V., Prokopovich M.A., Pushkar D.Y. Modern aspects of the radical treatment of the prostate cancer using robotic surgery. Tuberkulez i sotsial'no znachimye zabolvaniya = Tuberculosis and socially significant diseases 2014;3:66–71 (In Russ.)].
3. Мартов А.Г., Пархонин Д.И. Лапароскопическая тазовая лимфаденэктомия при локализованном раке простаты. Российский онкологический журнал 2010;6:39–41. [Martov A.G., Parkhonin D.I. Laparoscopic pelvic lymphadenectomy for located prostate cancer. Rossiysky Onkologichesky Zhurnal = Russian journal of oncology 2010;6:39–41 (In Russ.)].
4. Хмелевский Е.В., Панышин Г.А., Канчели И.Н., Хорошков В.С. Варианты гипофракционирования протонного буста при местнораспространенном раке простаты. Вопросы онкологии 2012;58(6):787–94. [Khmelevsky E.V., Panshin G.A., Kancheli I.N., Khoroshkov V.S. Options of hypofractionation of proton boost in locally advanced prostate cancer. Voprosy onkologii = Problems in oncology 2012;58(6):787–94 (In Russ.)].
5. Singh A., Cheedella N.K. S., Shakil S.A. et al. Liver Metastases in Prostate Carcinoma Represent a Relatively Aggressive Subtype Refractory to Hormonal Therapy and Short-Duration Response to Docetaxel Monotherapy. World J. Oncol. 2015;6(1):265–9. DOI: 10.14740/wjon903w. PMID: 29147414.
6. Фомкин Р.Н., Попков В.М., Шатылко Т.В. Альтернативный вариант комбинированного лечения локализованного рака простаты. Бюллетень медицинских Интернет-конференций 2016;6(2):296–300. [Fomkin R.N., Popkov V.M., Shatyлко T.V. Alternative variant of the combined treatment of a localized cancer of a prostate. Byulleten' meditsinskikh Internet-konferentsiy = Bulletin of Medical Internet Conferences 2016;6(2):296–300 (In Russ.)].
7. Аль-Шукри С.Х., Боровец С.Ю., Рыбалов М.А., Саидов Р.Б. Современные методы локальной терапии рака предстательной железы. Нефрология 2009;13(3):153–8. [Al-Shukri S.Kh., Borovets S.Yu., Rybalov M.A., Saidov R.B. Current methods for local treatment of prostate cancer. Nephrology 2009;13(3):153–8 (In Russ.)].
8. Фомкин Р.Н., Попков В.М., Маслякова Г.Н. и др. Роботизированная высокоинтенсивная сфокусированная ультразвуковая абляция в лечении локализованного рака простаты: 7 лет опыта. Бюллетень медицинских Интернет-конференций 2017;7(2):529–34. [Fomkin R.N., Popkov V.M., Maslyakova G.N. et al. Robotized high-intensive focused ultrasonic ablation in treatment of a localized cancer of a prostate: 7 years of experience. Byulleten' meditsinskikh Internet-konferentsiy = Bulletin of Medical Internet Conferences 2017;7(2):529–34 (In Russ.)].
9. Gheewala T., Skwor T., Munirathinam G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. Oncotarget 2017;8(18):30524–38. DOI: 10.18632/oncotarget.15496. PMID: 8430624.
10. Кашенко В.А., Распереза Д.В., Творогов Д.А., Добрун М.В. Фотодинамическая терапия: от фундаментальных исследований к практике. Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta = Вестник Санкт-Петербургского университета 2015;11(1):5–12. [Kashchenko V.A., Raspereza D.V., Tvorogov D.A., Dobrun M.B. Photodynamic therapy: from fundamental research to Practice. The bulletin of the St. Petersburg university 2015;11(1):5–12 (In Russ.)].
11. Zhu T.C., Kim M.M., Liang X. et al. In-vivo singlet oxygen threshold doses for PDT. Photonics Lasers Med. 2015;4(1):59–71. DOI: 10.1515/plm-2014-0037. PMID: 25927018.
12. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. CA Cancer J. Clin. 2011;61(4):250–81. DOI: 10.3322/caac.20114. PMID: 21617154.
13. Barrett T., Davidson S.R., Wilson B.C. et al. Dynamic contrast enhanced MRI as a predictor of vascular-targeted

- photodynamic focal ablation therapy outcome in prostate cancer post-failed external beam radiation therapy. *Can Urol Assoc J.* 2014;8(9–10):708–14. DOI: 10.5489/суај. 2176. PMID: 25408811.
14. Shafirstein G., Bellnier D., Oakley E. et al. Interstitial Photodynamic Therapy – A Focused Review. *Cancers (Basel)* 2017;9(2):E12. DOI: 10.3390/cancers9020012. PMID: 28125024.
15. Chilakamarthi U., Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem. Rec.* 2017;17(8): 775–802. DOI: 10.1002/tcr.201600121. PMID: 28042681.
16. Миронов А.Ф., Грин М.А. Сенситизаторы бактериохлоринового ряда: перспективы использования в фотодинамической терапии. *Вестник МИТХТ* 2006;(4):5–28. [Mironov A.F., Grin M.A. Bacteriochlorin sensitizers: prospects of use in photodynamic therapy. *Vestnik MITHT = Bulletin of Moscow state University of Fine Chemical Technologies* 2006;(4):5–28 (In Russ.)].
17. Krzykawska-Serda M., Dąbrowski J.M., Arnaut L.G. et al. The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 2014;73:239–51. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.003. PMID: 24835769.
18. Патент РФ на изобретение № 2549953/10.05.2015, Бюл. № 13. Макарова Е.А., Якубовская Р.И., Ворожцов Г.Н. и др. Фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии [Электронный ресурс]. [Patent RU № 2549953/10.05.2015, Bul. № 13. Makarova E.A., Jakubovskaja R.I., Vorozhtsov G.N., et al. Photosensitizers for photodynamic therapy (In Russ.)] URL: [http://www1.fips.ru/fips\\_serv1/fips\\_servlet](http://www1.fips.ru/fips_serv1/fips_servlet)
19. American Type Culture Collection (ATCC) [Электронный ресурс]. URL: [https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo\\_country=ru](https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=ru)
20. Институт цитологии РАН. Коллекция культур клеток позвоночных [Электронный ресурс]. URL: [http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk\\_ru.htm](http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk_ru.htm). [Institute of Cytology RAS – collection of cell cultures of vertebrates (In Russ.)].
21. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А. и др. Методические рекомендации по изучению фотоиндуцированных противоопухолевых свойств лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012:657–71.* [Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Karmakova T.A. et al. Methodical recommendations on the study of photoinduced antitumor properties of drugs. In: *Guide to conducting preclinical studies of medicines.* Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2012:657–71 (In Russ.)].

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Н.Б. Морозова / N.B. Morozova: <https://orcid.org/0000-0002-7159-805X>  
 А.Д. Плютинская / A.D. Plyutinskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6898-2931>  
 М.С. Воронцова / M.S. Vorontsova: <https://orcid.org/0000-0002-9320-1746>  
 А.А. Панкратов / A.A. Pankratov: <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>  
 Р.И. Якубовская / R.I. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9799-7622>  
 Е.А. Макарова / E.A. Makarova: <https://orcid.org/0000-0003-4144-6159>  
 Е.А. Лукьянец / E.A. Lukyanets: <https://orcid.org/0000-0002-8853-6912>  
 А.Д. Каприн / A.D. Kaprin: <https://orcid.org/0000-0001-8784-8415>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 14. N08.12.0049).

**Financing.** The study was performed with financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (government contract No. 14. N08.12.0049).

# ЭКВИТОКСИЧНОСТЬ ЦИСПЛАТИНА-РОНЦ® И ЦИСПЛАТИНА-ТЕВА ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ И КРЫСАМ

В.М. Бухман, Н.П. Ермакова, О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, А.А. Сергеев, В.А. Чалей  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Владимир Михайлович Бухман [bukhman@mail.ru](mailto:bukhman@mail.ru)

**Введение.** Разработка качественной отечественной воспроизведенной лекарственной формы цисплатина необходима для улучшения условий терапии онкологических пациентов.

**Цель исследования** – проведение сравнительного доклинического исследования острой токсичности недавно разработанной в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России воспроизведенной лекарственной формы Цисплатин-РОНЦ® с коммерческим препаратом Цисплатин-Тева.

**Материалы и методы.** Использованы стандартные методы оценки острой токсичности препаратов на мелких лабораторных грызунах.

**Результаты.** Острая токсичность сравниваемых форм цисплатина существенно не различается по влиянию на выживаемость и изменение массы тела подопытных животных.

**Вывод.** Сравнимые воспроизведенный и коммерческий препараты цисплатина практически эквитоксичны при однократном внутривенном введении мышам и крысам.

**Ключевые слова:** цисплатин воспроизведенный, цисплатин коммерческий, доклиническая токсичность, мелкие лабораторные грызуны

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-65-69

## EQUITOXICITY CISPLATIN-RONC® AND CISPLATIN-TEVA AT A SINGLE INJECTION TO MICE AND RATS

V.M. Bukhman, N.P. Ermakova, O.I. Konyayeva, N. Yu. Kulbachevskaya, A.A. Sergeev, V.A. Chaley

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** The development of high-quality domestic reproduced dosage form of cisplatin is necessary to improve the treatment conditions of cancer patients.

**Purpose of research.** Comparative preclinical study of acute toxicity of newly developed in SIC Oncology reproduced dosage form Cisplatin-RONC® with commercial preparation Cisplatin-Teva.

**Materials and methods.** The standard methods of estimation of acute toxicity of preparations on small laboratory rodents are used.

**Results.** Acute toxicity of the compared forms of cisplatin is not significantly different from the effect on the survival and body weight of experimental animals.

**Summary.** Compared generic and commercial formulations cisplatin almost equitoxic after a single intravenous administration to mice and rats.

**Key words:** generic cisplatin, cisplatin commercial, preclinical toxicity, small laboratory rodents

### Введение

В 2015 г. исполнилось 50 лет с того времени, когда была продемонстрирована высокая противоопухолевая эффективность цисплатина (ЦП) [1]. Цисплатин – алкилирующий агент, нарушающий синтез и транскрипцию дезоксирибонуклеиновой кислоты, продолжает оставаться одним из основных противоопухолевых препаратов, широко применяемых для лечения онкологических пациентов с солидными

опухолями. С помощью химиотерапевтических комбинаций, основным препаратом которых является ЦП, удается излечивать пациентов с раком яичек. Такие комбинации активны в отношении гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, головы и шеи, легких, а также других злокачественных заболеваний [2, 3]. При применении ЦП возникают многочисленные токсические и побочные эффекты [1, 2].

Привлекательным представляется применение дженериков. Их производство постоянно растет во всем мире, прежде всего из-за экономической эффективности. Однако необходимо проведение исследований с целью обеспечения биоэквивалентности с исходным лекарством [4]. Вместе с тем дженериковые лекарственные формы могут не полностью соответствовать брендовым формам, несколько отличаясь по проявлениям биологической активности [5, 6].

Разработка качественной отечественной воспроизведенной лекарственной формы ЦП необходима для улучшения условий терапии онкологических пациентов [7]. Одним из условий регистрации воспроизведенных лекарств является демонстрация на лабораторных животных их эквитоксичности с разрешенным для применения на территории Российской Федерации коммерческим препаратом.

Далее приведены основные данные по эквитоксичности недавно разработанной в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (ранее – РОНЦ им. Н.Н. Блохина) воспроизведенной лекарственной формы ЦП Цисплатин-РОНЦ® (ЦП-РОНЦ) и коммерческого препарата Цисплатин-Тева (ЦП-Тева).

## Материалы и методы

### Животные

Мыши-самцы гибриды (C57Bl6/J × DBA2) F1 (B6D2F1). В начале опытов средняя масса тела ± стандартное отклонение составляла 23,0 ± 1,2 г (20,2–25,6 г). Неинбредные крысы-самцы, средняя масса тела ± стандартное отклонение составляла 124 ± 15 г в 2 опыта (96–170 г). Все животные получены из питомника ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии). Животные содержались и использовались в соответствии с этическими нормами, принятыми в НМИЦ онкологии. Для кормления животных использовали стандартный промышленный сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Животные имели свободный доступ к корму и воде.

### Препараты

Воспроизведенный ЦП-РОНЦ произведен в научно-производственном филиале «Наукопрофи» НМИЦ онкологии. Препарат представляет собой раствор для инъекций с концентрацией 1 мг ЦП в 1 мл, во флаконах по 10 мл (серия 010212). Коммерческий ЦП-Тева производства фармацевтической компании Teva (Израиль) – раствор для инъекций с концентрацией 0,5 мг ЦП в 1 мл, во флаконах по 20 мл (серия 11B17RE). Для идентичности концентраций ЦП-РОНЦ разводили физиологическим раствором натрия хлорида до концентрации 0,5 мг ЦП в 1 мл.

## Сравнительные эксперименты

Оба препарата параллельно вводили внутривенно однократно в следующих диапазонах доз: мышам от 10 до 20 мг/кг, крысам от 4 до 13 мг/кг. День введения препаратов принимали за 0. Проявления токсичности оценивали по общепринятым критериям. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel 2003 и BioStat 2008 Professional. Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии. За достоверные принимали различия при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Сравнительное изучение

#### «острой» токсичности на мышах

Как видно из данных, представленных в табл. 1, выживаемость мышей практически одинакова в случае однократного введения сравниваемых препаратов как в зависимости от дозы, так и по срокам гибели. Расчетные летальные дозы достоверно не различались (табл. 2). Изменения массы тела в сравниваемых

Таблица 1. Сравнительная токсичность Цисплатина-РОНЦ® и Цисплатина-Тева при однократном внутривенном введении мышам

| Препарат        | Доза, мг/кг | Эффект (пало/всего) | День гибели        |
|-----------------|-------------|---------------------|--------------------|
| Контроль        | 0           | 0/10                | –                  |
| Цисплатин-РОНЦ® | 10          | 0/6                 | –                  |
|                 | 14          | 1/6                 | 8-й                |
|                 | 15          | 3/6                 | 8, 11, 13-й        |
|                 | 18          | 3/6                 | 7, 7, 8-й          |
|                 | 20          | 6/6                 | 6, 6, 6, 6, 8, 8-й |
| Цисплатин-Тева  | 10          | 0/6                 | –                  |
|                 | 14          | 0/6                 | –                  |
|                 | 15          | 2/6                 | 9, 11-й            |
|                 | 18          | 4/6                 | 7, 7, 8, 8-й       |
|                 | 20          | 6/6                 | 6, 6, 6, 6, 6, 8-й |

Таблица 2. Расчетные летальные дозы Цисплатина-РОНЦ® и Цисплатина-Тева на мышах

| Препарат        | ЛД10, мг/кг | ЛД16, мг/кг | ЛД50 (95 % ДИ), мг/кг | ЛД84, мг/кг |
|-----------------|-------------|-------------|-----------------------|-------------|
| Цисплатин-РОНЦ® | 11,79       | 12,81       | 16,44 (13,89–18,99)   | 20,06       |
| Цисплатин-Тева  | 12,73       | 13,55       | 16,45 (13,84–19,05)   | 19,34       |

Примечание. ДИ – доверительный интервал; ЛД – летальная доза.

Таблица 3. Изменение массы тела мышей в граммах после однократного внутривенного введения Цисплатина-РОНЦ® и Цисплатина-Тева

| Доза, мг/кг            | Средняя масса тела, г (± стандартная ошибка), на сутки опыта |                          |             |             |             |             |             |
|------------------------|--|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                        | 0-е  | 3-и                      | 7-е         | 10-е        | 14-е        | 21-е        | 30-е        |
| 0                      | 22,2 ± 0,5   | 24,1 ± 0,3               | 24,7 ± 0,2  | 25,7 ± 0,3  | 26,2 ± 0,4  | 27,6 ± 0,4  | 30,7 ± 0,5  |
| <b>Цисплатин-РОНЦ®</b> |  |                          |             |             |             |             |             |
| 10                     | 23,6 ± 0,4   | 21,3 ± 0,4*              | 22,1 ± 0,5* | 24,2 ± 0,3* | 24,4 ± 0,4* | 26,2 ± 0,3* | 30,6 ± 0,4  |
| 14                     | 23,9 ± 0,3*  | 20,5 ± 0,3* <sup>§</sup> | 19,3 ± 0,6* | 22,1 ± 0,2* | 22,8 ± 0,2* | 24,2 ± 0,5* | 29,1 ± 0,3* |
| 15 <sup>§</sup>        | 22,9 ± 0,4   | 22,3 ± 0,4*              | 17,5 ± 0,3* | 17,5 ± 1,2* | 18,7 ± 2,0* | 21,0 ± 2,6  | 22,9 ± 2,3  |
| 16 <sup>§</sup>        | 22,1 ± 0,3   | 21,4 ± 0,5*              | 15,4 ± 0,4* | 15,4 ± 0,8* | —           | —           | —           |
| 18 <sup>§</sup>        | 23,5 ± 0,4   | 20,6 ± 0,4*              | 17,1 ± 1,0* | 19,4 ± 1,0* | 20,9 ± 0,7* | 23,5 ± 0,9* | 27,8 ± 0,7* |
| 20 <sup>§</sup>        | 22,3 ± 0,4   | 20,6 ± 0,5*              | 16,2        | —           | —           | —           | —           |
| <b>Цисплатин-Тева</b>  |  |                          |             |             |             |             |             |
| 10                     | 23,7 ± 0,5   | 21,9 ± 0,4*              | 24,1 ± 1,2  | 24,2 ± 0,4* | 24,9 ± 0,4* | 26,4 ± 0,4  | 30,4 ± 0,4  |
| 14                     | 23,9 ± 0,4*  | 21,8 ± 0,3*              | 20,4 ± 1,2* | 22,0 ± 1,4* | 22,9 ± 1,3  | 24,9 ± 1,3  | 29,1 ± 1,5  |
| 15 <sup>§</sup>        | 22,3 ± 0,7   | 21,7 ± 0,6*              | 17,5 ± 0,3* | 18,4 ± 0,5* | 21,3 ± 0,3* | 24,2 ± 0,5* | 26,5 ± 0,3* |
| 16 <sup>§</sup>        | 22,3 ± 0,3   | 21,7 ± 0,5*              | 16,8 ± 0,4* | 15,4 ± 0,4* | 16,3 ± 0,2* | 17,8 ± 0,4* | 20,6 ± 0,4* |
| 18 <sup>§</sup>        | 23,6 ± 0,5   | 20,9 ± 0,5*              | 17,7 ± 0,9* | 22,7        | 23,5        | 25,2        | 30,0        |
| 20 <sup>§</sup>        | 22,5 ± 0,5   | 20,9 ± 0,3*              | —           | —           | —           | —           | —           |

**Примечание.** В каждой группе по 6 мышей. <sup>§</sup> В группах отмечалась гибель животных. «—» — гибель всех животных в группе (см. табл. 1). \* Достоверное отличие по сравнению с контрольной группой мышей, не получавших препараты. <sup>§</sup> Достоверное отличие по сравнению с группой мышей, получавших Цисплатин-Тева.

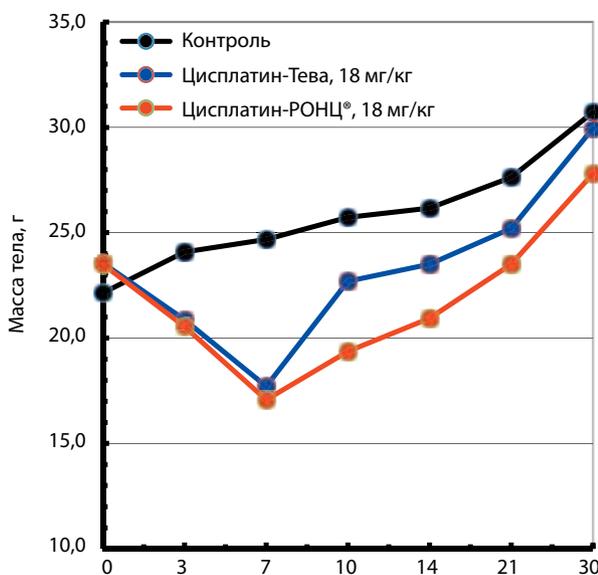


Рис. 1. Изменение массы тела мышей после однократного внутривенного введения Цисплатина-РОНЦ® и Цисплатина-Тева

группах также оказались практически одинаковыми как по динамике, так и по наибольшей потере массы тела (табл. 3, рис. 1).

#### Сравнительное изучение «острой» токсичности на крысах

В результате проведенных исследований установлено, что ЦП-РОНЦ® и ЦП-Тева показывают практически одинаковую количественную токсичность на крысах по срокам гибели и по числу павших животных (табл. 4). Расчетные летальные дозы также достоверно не различались (табл. 5).

Динамика массы тела сравниваемых групп крыс также оказалась сходной (табл. 6, рис. 2).

#### Вывод

Сравниваемые воспроизведенный и коммерческий препараты цисплатина практически эквитоксичны при однократном внутривенном введении мышам и крысам.

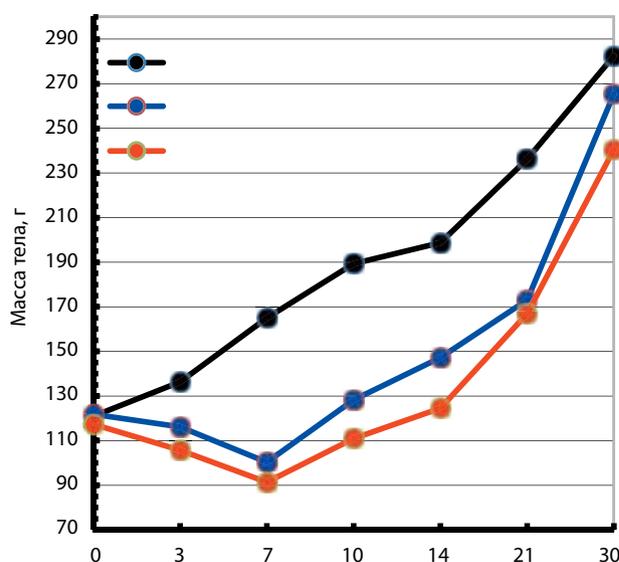
**Таблица 4.** Сравнительная токсичность Цисплатина-РОНЦ® и Цисплатина-Тева при однократном внутривенном введении крысам

| Препарат        | Доза, мг/кг | Эффект (пало/всего) | День гибели           |
|-----------------|-------------|---------------------|-----------------------|
| Цисплатин-РОНЦ® | 4           | 0/6                 | —                     |
|                 | 5           | 0/6                 | —                     |
|                 | 6           | 0/6                 | —                     |
|                 | 7           | 0/6                 | —                     |
|                 | 7,5         | 1/6                 | 6                     |
|                 | 8           | 1/12                | 7                     |
|                 | 8,5         | 0/6                 | —                     |
|                 | 9           | 6/12                | 2, 5, 7, 10, 10, 20-й |
|                 | 11          | 6/6                 | 5, 5, 6, 6, 6, 6-й    |
| 13              | 6/6         | 5, 5, 5, 5, 5, 5-й  |                       |
| Цисплатин-Тева  | 4           | 0/6                 | —                     |
|                 | 5           | 0/6                 | —                     |
|                 | 6           | 1/6                 | 6-й                   |
|                 | 7           | 2/6                 | 15, 22-й              |
|                 | 7,5         | 0/6                 | —                     |
|                 | 8           | 2/12                | 6, 15-й               |
|                 | 8,5         | 4/6                 | 6, 6, 10, 10-й        |
|                 | 9           | 7/12                | 5, 5, 5, 5, 5, 5, 6-й |
|                 | 11          | 6/6                 | 4, 4, 4, 5, 5, 5-й    |
| 13              | 6/6         | 4, 4, 4, 5, 5, 5-й  |                       |

**Таблица 5.** Расчетные токсические дозы Цисплатина-РОНЦ® и Цисплатина-Тева на крысах

| Препарат        | ЛД10, мг/кг | ЛД16, мг/кг | ЛД50 (95 % ДИ), мг/кг | ЛД84, мг/кг |
|-----------------|-------------|-------------|-----------------------|-------------|
| Цисплатин-РОНЦ® | 7,11        | 7,60        | 9,34 (8,42–10,26)     | 11,09       |
| Цисплатин-Тева  | 5,93        | 6,48        | 8,44 (7,58–9,31)      | 10,40       |

*Примечание.* ДИ – доверительный интервал; ЛД – летальная доза.



**Рис. 2.** Изменение массы тела крыс после однократного внутривенного введения Цисплатина-РОНЦ® и Цисплатина-Тева

**Таблица 6.** Изменение массы тела крыс после однократного внутривенного введения Цисплатина-РОНЦ® и Цисплатина-Тева

| Доза, мг/кг            | Масса тела, г, на сутки опыта |          |           |                       |                       |                        |                       |
|------------------------|-------------------------------|----------|-----------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|                        | 0-е                           | 3-и      | 7-е       | 10-е                  | 14-е                  | 21-е                   | 30-е                  |
| 0                      | 121 ± 2                       | 136 ± 3  | 165 ± 6   | 189 ± 8               | 199 ± 10              | 236 ± 8                | 282 ± 13              |
| <b>Цисплатин-РОНЦ®</b> |                               |          |           |                       |                       |                        |                       |
| 4                      | 119 ± 5                       | 120 ± 6* | 138 ± 8*  | 162 ± 9               | 176 ± 8               | 186 ± 10* <sup>§</sup> | 247 ± 13 <sup>§</sup> |
| 5                      | 112 ± 4                       | 120 ± 9  | 129 ± 4*  | 155 ± 6* <sup>§</sup> | 172 ± 3* <sup>§</sup> | 197 ± 3* <sup>§</sup>  | 267 ± 10              |
| 6                      | 123 ± 5                       | 123 ± 6  | 122 ± 10* | 141 ± 8*              | 157 ± 9*              | 175 ± 9*               | 247 ± 10              |
| 8                      | 117 ± 5                       | 106 ± 4* | 91 ± 6*   | 111 ± 12*             | 125 ± 15*             | 167 ± 18*              | 241 ± 26              |
| <b>Цисплатин-Тева</b>  |                               |          |           |                       |                       |                        |                       |
| 4                      | 119 ± 4                       | 120 ± 4* | 146 ± 6*  | 171 ± 4               | 187 ± 4               | 217 ± 5                | 288 ± 6               |
| 5                      | 119 ± 6                       | 116 ± 7* | 122 ± 9*  | 129 ± 9*              | 144 ± 11*             | 170 ± 10*              | 266 ± 22              |
| 6 <sup>§</sup>         | 113 ± 1*                      | 109 ± 3* | 124 ± 4*  | 148 ± 4*              | 165 ± 4*              | 192 ± 5*               | 277 ± 10              |
| 8                      | 122 ± 5                       | 116 ± 4* | 100 ± 5*  | 128 ± 7*              | 147 ± 7*              | 173 ± 7*               | 265 ± 15              |

*Примечание.* В каждой группе по 6 крыс. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка. <sup>§</sup> В группе отмечалась гибель животных. \* Достоверное отличие по сравнению с контрольной группой крыс, не получавших препараты. <sup>§</sup> Достоверное отличие по сравнению с соответствующей группой крыс, получавших препарат сравнения Цисплатин-Тева в той же дозе.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Apps M.G., Choi E.H., Wheate N.J. The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocr Relat Cancer* 2015;22(4):219–33. DOI: 10.1530/ERC-15-0237. PMID: 26113607.
2. Гарин А.М., Базин И.С. Справочник по лекарственной терапии солидных опухолей. М.: ИНФОТЕХ: ЛЕКРУС, 2015. 529 с. [Garin A.M., Bazin I.S. Guide to drug therapy solid tumors. Moscow: INFOTECH: LEKRUS, 2015. 529 p. (In Russ.)].
3. Ревтович М.Ю., Бычковский П.М., Юркштович Т.Л. и др. Сравнительная оценка противоопухолевой активности водного раствора цисплатина и его гидрогелевой формы в эксперименте *in vivo*. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):95–6. [Reutovich M.Yu., Bychkovsky P.M., Yurkshovich T.L. et al. Comparative evaluation of the antitumor activity of an aqueous solution of cisplatin and its hydrogel form in an *in vivo* experiment. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):95–6 (In Russ.)].
4. Adler-Moore J.P., Gangneux J.P., Pappas P.G. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B *Med Mycol* 2016;54(3):223–31. DOI: 10.1093/mmy/myv111. PMID: 26768369.
5. Niho S., Yamanaka T., Umemura S. et al. Renal toxicity caused by brand-name versus generic cisplatin: a comparative analysis. *Jpn J Clin Oncol*. 2013;43(4):390–5. DOI: 10.1093/jjco/hyt020. PMID: 23444114.
6. Sekine I., Kubota K., Tamura Y. et al. Innovator and generic cisplatin formulations: comparison of renal toxicity. *Cancer Sci* 2011;102(1):162–5. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01764.x. PMID: 21054679.
7. Давыдов М.И. Обращение главного редактора. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2015–2016;26–27(4–1):3–4. [Davydov M.I. The appeal of the editor-in-chief. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin Russian cancer research center* 2015–2016;26–27(4–1): 3–4 (In Russ.)].

**ORCID авторов / ORCID of authors**

В.М. Бухман / V.M. Bukhman: <https://orcid.org/0000-0002-7062-798X>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

## ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ЛХС-1208 НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ

Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова, О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, Т.В. Абрамова,  
В.А. Чалей, А.А. Николина, В.М. Бухман

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

**Контакты:** Надежда Павловна Ермакова [ne518@yandex.ru](mailto:ne518@yandex.ru)

**Введение.** В данной работе представлен фрагмент доклинического токсикологического изучения нового российского противоопухолевого препарата производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208 – исследование кардиотоксичности, которая является одним из специфических осложнений противоопухолевой химиотерапии.

**Цель исследования** – доклиническое токсикологическое изучение влияния препарата ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему животных для оценки его кардиотоксического действия.

**Материалы и методы.** Исследования проводились на 40 здоровых неинбредных беспородных крысах-самцах и 4 собаках породы бигль, самцах и самках. Препарат вводили ежедневно 15-кратно крысам – внутривенно в суммарных дозах 50, 100 и 200 мг/кг; собакам – внутривенно в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг. Срок наблюдения за крысами составил 30 сут, за собаками – 60 сут. Оценивали изменения показателей электрокардиограммы, макроскопическую и гистологическую картину изменений сердца и изменения биохимических показателей активности ферментов – лактатдегидрогеназы, аспаратаминотрансферазы.

**Результаты.** У крыс ЛХС-1208 на протяжении всего срока наблюдения вызывал функциональные изменения показателей электрокардиограммы: увеличение интервалов PQ и QT и нарушение сердечного ритма (выпадение зубца R), что свидетельствует о нарушении электрической проводимости. Морфологические изменения в сердечной мышце были выявлены на 3-и сутки наблюдения в суммарных дозах 100 и 200 мг/кг, которые сохранялись до 30 сут наблюдения только у животных, получавших препарат в суммарной дозе 200 мг/кг. У собак на разных сроках наблюдения препарат вызывал функциональные изменения электрической активности сердца: увеличение интервала QRS, инверсию зубца T, появление глубокого зубца Q. Отмечали увеличение активности лактатдегидрогеназы и аспаратаминотрансферазы по сравнению с фоновыми показателями. Морфологические изменения в сердечной мышце были выявлены на 3-и сутки наблюдения только в суммарной дозе 30 мг/кг, которые сохранялись до 60 сут наблюдения.

**Заключение.** Установлено, что новый российский противоопухолевый препарат ЛХС-1208 обладает кардиотоксическим действием, вызывая функциональные изменения сердечно-сосудистой системы крыс во всех изученных дозах, а собак – только после применения препарата в максимальной дозе. Морфологически кардиотоксичность не обнаружена у животных, получавших минимальную дозу препарата, и подтверждена только у животных, получавших максимальную дозу препарата.

**Ключевые слова:** новый противоопухолевый препарат, производное N-гликозида индолокарбазола, кардиотоксичность, крысы, собаки

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-70-80

### THE INFLUENCE OF THE DRUG LHS-1208 ON CARDIOVASCULAR SYSTEM

N.P. Ermakova, I.B. Merkulova, O.I. Konyaeva, N. Yu. Kulbachevskaya, T.V. Abramova,  
V.A. Chaley, A.A. Nikolina, V.M. Bukhman

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** This article presents a fragment of a preclinical toxicological study of a new Russian anticancer drug derived from n-glycoside indolocarbazole LCS-1208 – study of cardiotoxicity, which is one of the specific complications of anticancer chemotherapy.

**Objective.** Preclinical toxicological study of the effect of the drug LCS-1208 on the cardiovascular system of animals to assess its cardiotoxic effects.

**Materials and methods.** Studies were conducted on 40 healthy non-harmless mongrel male rats and 4 dogs Beagle, male and female. The drug was administered daily 15 times to rats-intraperitoneal in total doses of 50, 100 and 200 mg/kg; to dogs – intravenously in total doses of 20 and 30 mg/kg. The period of observation of rats was 30 days, for dogs was 60 days. Changes in electrocardiogram indices, macroscopic and histological picture of heart changes and changes in biochemical parameters of enzymes activity – lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase were evaluated.

**Results.** In rats LCS-1208 throughout the period of observation caused functional changes in electrocardiogram: increase in PQ and QT intervals and cardiac rhythm disturbance (loss of R wave), which indicates a violation of electrical conductivity. Morphological changes

in the heart muscle were detected on the 3<sup>rd</sup> day of observation in total doses of 100 and 200 mg/kg, which remained until 30 days of observation only in animals receiving the drug in the total dose of 200 mg/kg. In some dogs for different periods of observation the drug caused functional changes in the electrical activity of the heart: an increase in the QRS interval, the inversion of the T wave, the appearance of a deep Q wave and an increase in the activity of lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase compared to background indicators. Morphological changes in the heart muscle were detected on the 3<sup>rd</sup> day of observation only in the total dose of 30 mg/kg, which persisted up to 60 days of observation.

**Conclusion.** It was found that the new Russian anticancer drug LHC-1208, a derivative of indocarbazole N-glycoside, has a cardiotoxic effect, causing functional changes in the cardiovascular system of rats in all doses studied, and in dogs only in the maximum dose. Morphologically, cardiotoxicity is not confirmed in animals receiving a minimal dose of the drug, but only in animals receiving the maximum dose of the drug.

**Key words:** new antitumor drug, derivative of N-glycosides of indolocarbazole, cardiotoxicity, rats, dogs

## Введение

Кардиотоксичность является одним из специфических системных осложнений противоопухолевой химиотерапии. Прогноз осложнений кардиотоксического действия нового препарата в эксперименте на животных — одна из наиболее сложных проблем доклинической токсикологии. Влияние противоопухолевых препаратов на сердечно-сосудистую систему определяется нередко только при их клиническом применении. Проявления кардиотоксичности противоопухолевых препаратов различаются по времени возникновения: ранние, более поздние и отсроченные (спустя недели и месяцы после начала лечения). Такие проявления кардиотоксичности противоопухолевых препаратов, как изменение артериального давления, боли в сердце, нарушение сердечного ритма, развитие миокардита, перикардита, инфаркта миокарда и тяжелой сердечной недостаточности, не только снижают субъективное качество жизни онкологических больных, но иногда становятся основной причиной неназначения или отмены препарата [1–3]. Для некоторых противоопухолевых препаратов кардиотоксичность является лимитирующей. К ним относятся в основном антрациклиновые противоопухолевые антибиотики: адриамицин, эпирубицин, рубомицин, карминомицин, оливомицин. Реже развивается кардиотоксичность при использовании других препаратов — циклофосфана, фторурацила, этопозида, тенипозида, паклитаксела, транструзумаба, лапатиниба [1–3]. Предклиническая оценка характера кардиотропного действия противоопухолевых препаратов, прогнозирование их кардиотоксичности при применении в клинике решают конкретные вопросы безопасности их применения, а также позволяют избежать неопределенностей в диагностике изменений со стороны сердечно-сосудистой системы, возникших при фармакотерапии.

ЛХС-1208 — новый противоопухолевый препарат на основе N-гликозида индокарбазола, был создан и изучен в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Субстанция препарата синтезирована в лаборатории химического синтеза

[4–9]. В лаборатории разработки лекарственных форм была создана инъекционная лекарственная форма — ЛХС-1208 [10]. В лаборатории экспериментальной химиотерапии изучена противоопухолевая активность и механизм противоопухолевого действия данного лекарственного средства [11–16], что стало основанием для доклинического изучения токсичности этого препарата, которое было проведено в лаборатории фармакологии и токсикологии и результаты которого были частично представлены в виде статей и тезисов [17–23].

В данной работе представлен фрагмент доклинического токсикологического изучения ЛХС-1208 — исследование кардиотоксичности.

## Материалы и методы

Исследование проводили на стандартных сертифицированных животных в соответствии с российскими и международными требованиями по использованию животных моделей [24–26]. Работа проведена в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [27, 28].

Работа проведена на 40 здоровых неинбредных беспородных крысах-самцах и на 4 собаках разного пола (3 самки и 1 самец) породы бигль. Животные были получены из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животные содержались в стандартных условиях вивария.

Препарат крысам вводили внутривенно ежедневно (в течение 15 дней) в суммарных дозах 50, 100 и 200 мг/кг. Дозы для крыс рассчитывали исходя из данных, полученных в результате изучения острой токсичности на крысах. Препарат собакам вводили внутривенно ежедневно (в течение 15 дней) в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг. Дозы для собак рассчитывали исходя из данных, полученных в результате изучения субхронической токсичности препарата на крысах. Препарат ЛХС-1208 — лиофилизат, содержащий во флаконе 9 мг активного вещества. Содержимое флакона растворяли в 3 мл воды для инъекций до получения рекомендованной концентрации — 3,0 мг

в 1 мл воды для инъекций. Объем вводимого раствора рассчитывали на основании массы тела животного в соответствии с дозой.

Взятие биологического материала — крови для биохимического исследования — проводили у собак за 3 дня до начала введения препарата (фон 1), на 0 день до введения препарата (фон 2) и на 3, 7, 14, 21, 30, 45 и 60-е сутки после последнего введения препарата. Взятие крови у крыс для биохимического исследования производили на 3-и и 30-е сутки наблюдения после последнего введения препарата. В сыворотке крови животных оценивали активности аспартат-аминотрансферазы (АСТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы оценивали с помощью электрокардиографии (ЭКГ) у собак за 3 дня (фон 1) до начала введения препарата, на 0 день до введения препарата (фон 2) и на 3, 7, 14, 21, 30, 45 и 60-е сутки после последнего введения препарата. Электрокардиограмму у крыс регистрировали за 3 дня (фон) до начала введения препарата и на 3, 15 и 30-е сутки после последнего введения препарата. Для обеспечения беспрепятственной регистрации ЭКГ крыс подвергали легкому поверхностному ингаляционному наркозу с помощью диэтилового эфира. Исследования ЭКГ проводили на электрокардиографе SCHILLER AT-1 (Швейцария) при скорости протяжки ленты 50 мм/с. Анализ ЭКГ животных проводили в соответствии с методиками [29–31] с учетом оценки биохимических показателей сыворотки крови крыс и собак. Крыс выводили из эксперимента на 3-и и 30-е сутки, а собак на 3-и и 60-е сутки наблюдения.

Для гистологического исследования брали фрагменты сердца. Материал подвергали общепринятой гистологической обработке [32]. Гистологические препараты анализировали и фотографировали при увеличениях 100, 400, используя микроскоп Leica DM1000 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office и BioStat Professional. Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии. За достоверные принимали различия при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

#### *Влияние ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему крыс*

При изучении влияния ЛХС-1208 на функцию сердца установлено, что препарат при ежедневном (в течение 15 дней) внутривентральном введении крысам в суммарных дозах 50, 100 и 200 мг/кг на всех сроках наблюдения вызывал изменения ЭКГ животных. Частота сердечных сокращений (ЧСС) досто-

верно уменьшалась, а интервал RR соответственно увеличивался у крыс, получивших препарат во всех дозах и на все сроки наблюдения по сравнению с фоновыми показателями, а у контрольных животных — только на 30-е сутки наблюдения (влияние многократного эфирного наркоза при регистрации ЭКГ). Частота сердечных сокращений и интервал RR у крыс, получивших препарат во всех дозах и на все сроки наблюдения, не изменялись по сравнению с показателями контрольных животных (табл. 1). При макроскопической оценке всех крыс на 3-и и 30-е сутки наблюдения макроскопические изменения в сердце не выявлены.

У крыс после введения препарата в суммарной дозе 50 мг/кг интервал PQ достоверно увеличивался на 30-е сутки наблюдения по сравнению с фоновыми показателями и недостоверно — по сравнению с данными контрольных животных (см. табл. 1). Выявлено нарушение сердечного ритма, связанного с электрической проводимостью: наблюдалась аритмия, проявляющаяся выпадением каждого 3-го или 5-го комплекса QRS, при наличии зубца P после введения ЛХС-1208 на все сроки наблюдения у 40 % крыс. Среди контрольных животных наблюдалась такая же аритмия на 14-е и 30-е сутки наблюдения у 20 % крыс. Однако при патоморфологическом исследовании на 3-и и 30-е сутки наблюдения макроскопические и гистологические изменения в сердце не выявлены (рис. 1а), морфологическая картина миокарда крыс после введения препарата не отличалась от таковой у контрольной группы животных (рис. 1б).

Поскольку морфологически функциональные изменения, отмеченные при применении препарата в суммарной дозе 50 мг/кг, не подтверждаются, мы расцениваем эти изменения как погрешность методики регистрации ЭКГ (влияние многократного эфирного наркоза) и считаем суммарную дозу 50 мг/кг некардиотоксичной.

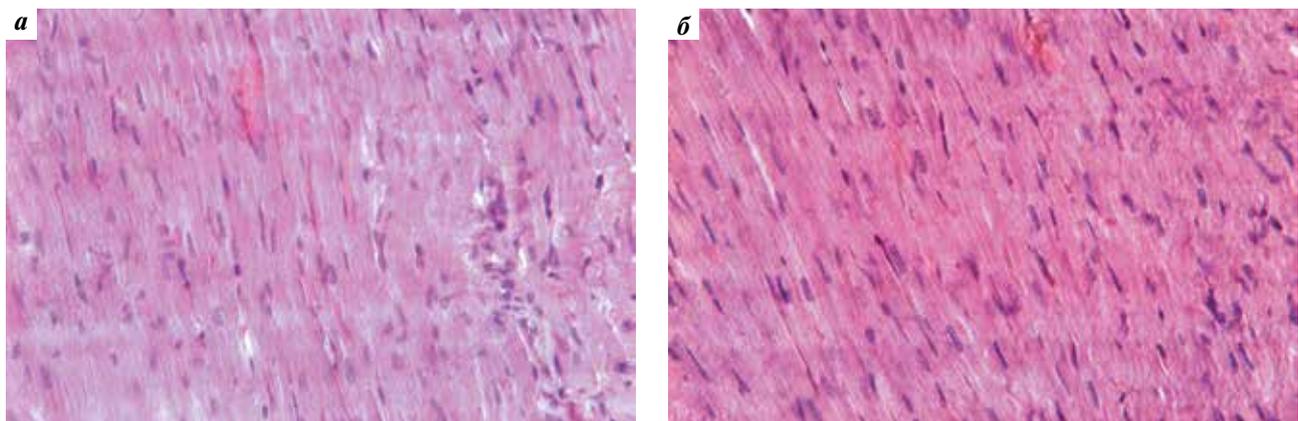
У крыс после введения препарата в суммарной дозе 100 мг/кг интервал QT достоверно увеличился по сравнению с фоновыми показателями и показателями контрольных животных на 3-и сутки наблюдения (см. табл. 1). При гистологическом исследовании в миокарде крыс обнаружены участки гиперэозинофильных кардиомиоцитов (участки дистрофии и ишемии) (рис. 2а). Выявленные изменения полностью обратимы к 30-м суткам опыта.

У крыс после введения препарата в суммарной дозе 200 мг/кг интервал PQ увеличился по сравнению с фоновыми показателями на 30-е сутки наблюдения (см. табл. 1). После применения препарата в суммарной дозе 200 мг/кг микроскопические изменения миокарда более выражены, чем при применении препарата в суммарной дозе 100 мг/кг. Отмечено неравномерное окрашивание кардиомиоцитов эозином,

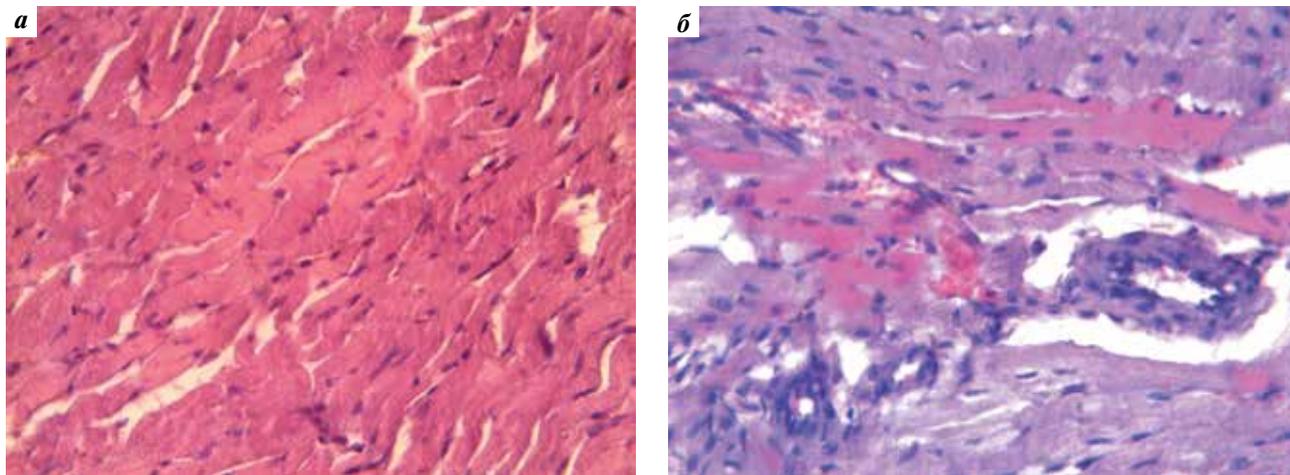
**Таблица 1.** Показатели электрокардиограммы неинбредных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутривнутрибрюшинного введения ЛХС-1208

| Доза, мг/кг, разовая/суммарная | Сутки опыта   |                 |                |                |
|--------------------------------|---------------|-----------------|----------------|----------------|
|                                | фон           | 3-и             | 15-е           | 30-е           |
| <b>ЧСС, уд./мин</b>            |               |                 |                |                |
| 3,3/50                         | 452,2 ± 13,7  | 407,2 ± 26,3*   | 382,2 ± 19,4*  | 344,8 ± 32,8*  |
| 6,7/100                        | 458,2 ± 19,2  | 397,8 ± 11,6*   | 394,2 ± 16,5*  | 370,0 ± 17,7*  |
| 13,3/200                       | 477,0 ± 9,4   | 414,6 ± 10,8*   | 404,8 ± 15,0*  | 393,2 ± 13,5*  |
| Контроль                       | 432,4 ± 26,9  | 399,4 ± 13,1    | 373,2 ± 23,1   | 357,4 ± 23,7*  |
| <b>RR, с</b>                   |               |                 |                |                |
| 3,3/50                         | 0,133 ± 0,004 | 0,150 ± 0,010*  | 0,159 ± 0,009* | 0,182 ± 0,022* |
| 6,7/100                        | 0,138 ± 0,007 | 0,151 ± 0,004*  | 0,153 ± 0,007* | 0,164 ± 0,008* |
| 13,3/200                       | 0,126 ± 0,003 | 0,142 ± 0,002*  | 0,149 ± 0,006* | 0,153 ± 0,005* |
| Контроль                       | 0,141 ± 0,009 | 0,151 ± 0,005   | 0,163 ± 0,011  | 0,171 ± 0,012* |
| <b>PQ, с</b>                   |               |                 |                |                |
| 3,3/50                         | 0,056 ± 0,002 | 0,060 ± 0,005   | 0,060 ± 0,005  | 0,074 ± 0,012* |
| 6,7/100                        | 0,056 ± 0,002 | 0,058 ± 0,005   | 0,060 ± 0,000  | 0,060 ± 0,000  |
| 13,3/200                       | 0,050 ± 0,003 | 0,056 ± 0,002   | 0,054 ± 0,002  | 0,064 ± 0,004* |
| Контроль                       | 0,054 ± 0,002 | 0,058 ± 0,002   | 0,062 ± 0,005  | 0,062 ± 0,005  |
| <b>QT, с</b>                   |               |                 |                |                |
| 3,3/50                         | 0,038 ± 0,002 | 0,038 ± 0,002   | 0,036 ± 0,002  | 0,038 ± 0,002  |
| 6,7/100                        | 0,034 ± 0,002 | 0,040 ± 0,000** | 0,034 ± 0,002  | 0,036 ± 0,002  |
| 13,3/200                       | 0,036 ± 0,002 | 0,036 ± 0,002   | 0,032 ± 0,002  | 0,034 ± 0,002  |
| Контроль                       | 0,036 ± 0,002 | 0,036 ± 0,002   | 0,034 ± 0,002  | 0,038 ± 0,002  |
| <b>QRS, с</b>                  |               |                 |                |                |
| 3,3/50                         | 0,020 ± 0,000 | 0,018 ± 0,002   | 0,016 ± 0,002  | 0,020 ± 0,000  |
| 6,7/100                        | 0,020 ± 0,000 | 0,020 ± 0,000   | 0,020 ± 0,000  | 0,020 ± 0,000  |
| 13,3/200                       | 0,018 ± 0,002 | 0,020 ± 0,000   | 0,016 ± 0,002  | 0,020 ± 0,000  |
| Контроль                       | 0,018 ± 0,002 | 0,018 ± 0,002   | 0,018 ± 0,002  | 0,020 ± 0,000  |

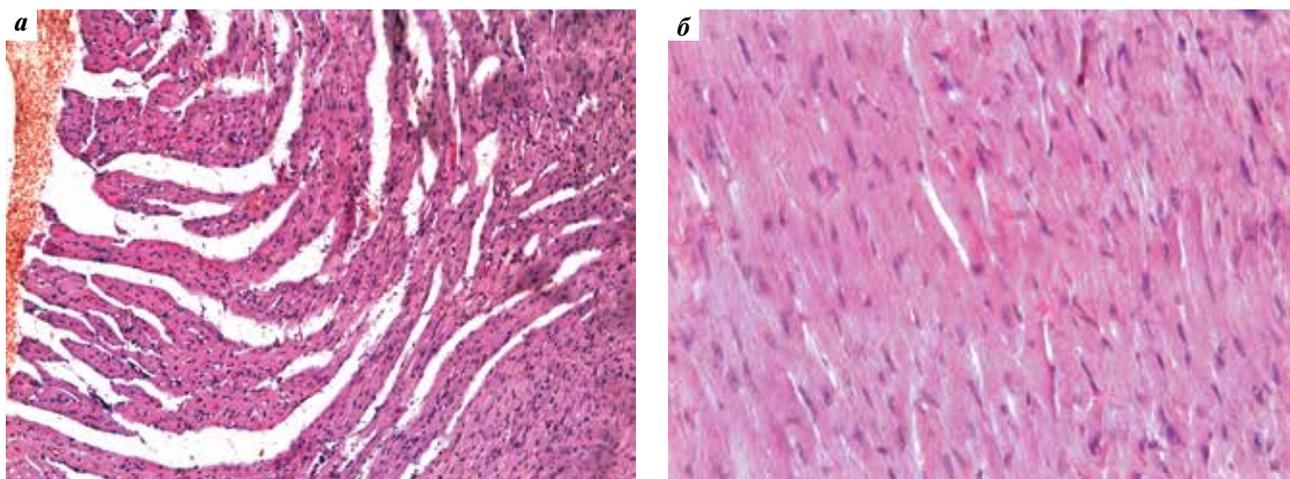
**Примечание.** ЧСС – частота сердечных сокращений. \* $p < 0,05$  статистически достоверно по сравнению с фоном; \*\* $p < 0,05$  статистически достоверно по сравнению с фоном и с контролем.



**Рис. 1.** Сердце (миокард) крысы. Структура мышечных волокон не нарушена: а – сердце (миокард) крысы, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 50 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Структура мышечных волокон не нарушена. Окраска: гематоксилин и эозин, × 400; б – сердце (миокард) крысы. Контроль. Структура мышечных волокон не нарушена. Окраска: гематоксилин и эозин, × 400



**Рис. 2.** Сердце (миокард) крысы. Кардиомиоциты с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (ишемии), 3-и сутки наблюдения: а – сердце (миокард) крысы, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 100 мг/кг. Участки гиперэозинофильных кардиомиоцитов с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (ишемии). Окраска: гематоксилин и эозин,  $\times 400$ ; б – сердце (миокард) крысы, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 200 мг/кг. Кардиомиоциты с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (гипоксии). Окраска: гематоксилин и эозин,  $\times 400$



**Рис. 3.** Сердце (миокард) крыс, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 200 мг/кг: а – 3-и сутки наблюдения. Отек, разрыхление структуры мышечных волокон, отдельные кардиомиоциты гиперэозинофильны. Окраска: гематоксилин и эозин,  $\times 100$ ; б – 30-е сутки наблюдения. Несильно выраженные дистрофические изменения и гиперэозинофилия некоторых кардиомиоцитов. Окраска: гематоксилин и эозин,  $\times 400$

обнаружены участки отдельных кардиомиоцитов или их групп с повышенной гиперэозинофильной окраской и сильно набухшей саркоплазмой, что косвенно считают признаком гипоксии и дистрофии миокарда [33] (рис. 2б).

У отдельных крыс, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 200 мг/кг, на 3-и сутки наблюдения, кроме вышеуказанных изменений, отмечены отек и разрыхление мышечных волокон миокарда (рис. 3а). На 30-е сутки наблюдения у крыс сохраняются изменения миокарда: признаки дистрофических изменений в виде набухания и гиперэозинофилии отдельных кардиомиоцитов (рис. 3б).

Влияния ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему крыс по биохимическим показателям крови не выявлено.

#### **Влияние ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему собак**

При изучении влияния ЛХС-1208 на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы собак установлено, что препарат при ежедневном 15-кратном внутривенном введении в суммарной дозе 20 мг/кг не вызывал, а в суммарной дозе 30 мг/кг вызывал изменения ЭКГ животных. Выявлено увеличение показателей временных интервалов сердечных сокращений при сравнении с фоновыми показателями после введения ЛХС-1208 (табл. 2). У собаки, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг, на 3-и сутки наблюдения увеличивался интервал QRS (см. табл. 2). Во всех изученных дозах на ЭКГ собак были выявлены незначительные изменения (в пределах

Таблица 2. Показатели электрокардиограммы у собак после ежедневного внутривенного введения препарата ЛХС-1208 в течение 15 дней

| Суммарная доза, мг/кг | Номер собаки | Пол | Сутки опыта |       |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------|--------------|-----|-------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
|                       |              |     | фон 1       | фон 2 | 3-и  | 7-е  | 14-е | 21-е | 30-е | 45-е | 60-е |
| <b>ЧСС, уд./мин</b>   |              |     |             |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 20                    | 1            | ♂   | 163         | 135   | 122  | 167  | 176  | 140  | 133  | 135  | 136  |
| 20                    | 2*           | ♀   | 176         | 136   | 118  | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 3*           | ♀   | 111         | 116   | 113  | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 4            | ♀   | 97          | 102   | 91   | 95   | 106  | 107  | 100  | 105  | 101  |
| <b>RR, с</b>          |              |     |             |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 20                    | 1            | ♂   | 0,37        | 0,44  | 0,49 | 0,36 | 0,34 | 0,43 | 0,45 | 0,45 | 0,44 |
| 20                    | 2*           | ♀   | 0,34        | 0,44  | 0,51 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 3*           | ♀   | 0,54        | 0,52  | 0,53 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 4            | ♀   | 0,62        | 0,59  | 0,56 | 0,63 | 0,57 | 0,59 | 0,60 | 0,57 | 0,60 |
| <b>PQ, с</b>          |              |     |             |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 20                    | 1            | ♂   | 0,10        | 0,12  | 0,12 | 0,12 | 0,14 | 0,14 | 0,12 | 0,12 | 0,12 |
| 20                    | 2*           | ♀   | 0,12        | 0,12  | 0,12 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 3*           | ♀   | 0,11        | 0,12  | 0,14 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 4            | ♀   | 0,12        | 0,12  | 0,13 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,14 |
| <b>QT, с</b>          |              |     |             |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 20                    | 1            | ♂   | 0,18        | 0,22  | 0,20 | 0,20 | 0,24 | 0,20 | 0,20 | 0,22 | 0,23 |
| 20                    | 2*           | ♀   | 0,16        | 0,20  | 0,22 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 3*           | ♀   | 0,18        | 0,20  | 0,20 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 4            | ♀   | 0,22        | 0,22  | 0,24 | 0,22 | 0,24 | 0,22 | 0,24 | 0,24 | 0,24 |
| <b>QRS, с</b>         |              |     |             |       |      |      |      |      |      |      |      |
| 20                    | 1            | ♂   | 0,03        | 0,03  | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,04 |
| 20                    | 2*           | ♀   | 0,02        | 0,02  | 0,03 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 3*           | ♀   | 0,04        | 0,04  | 0,06 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 30                    | 4            | ♀   | 0,04        | 0,03  | 0,05 | 0,05 | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,04 | 0,05 |

*Примечание.* ЧСС – частота сердечных сокращений. \*Собака выведена из эксперимента на 3-и сутки после окончания введения препарата.

физиологической нормы) – увеличение интервалов PQ и интервалов QT (см. табл. 2).

У собаки № 1, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг, выявлены увеличение активности ЛДГ на 21-е и 45-е сутки наблюдения в 3,9 в 1,8 раза соответственно и увеличение активности ферментов АСТ на 21-е сутки в 1,5 раза по сравнению с фоновыми показателями (табл. 3).

У собаки № 2, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг, изменений интервалов на ЭКГ и изменений биомаркеров не выявлено. На 3-и и 60-е сутки после применения препарата в сердце собак № 1 и № 2 при макроскопическом и гистологиче-

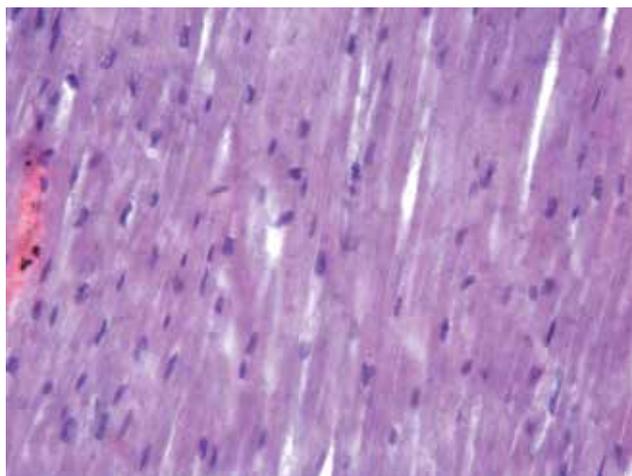
ском исследовании структура сердца не нарушена – эндокард, миокард, эпикард, перикард не повреждены, кардиомиоциты без изменений (рис. 4).

У собаки № 3, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг, на 3-и сутки наблюдения увеличивались интервал QRS (см. табл. 2) и показатель активности ЛДГ в 2,2 раза (см. табл. 3). У собак № 3 и № 4, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг, в сердце макроскопические изменения также не были выявлены. При гистологическом исследовании на 3-и сутки наблюдения у собаки № 3 в миокарде левого желудочка обнаружены очаговые изменения – отдельные кардиомиоциты или их

**Таблица 3.** Биохимические показатели активности ферментов в сыворотке крови собак после ежедневного внутривенного введения ЛХС-1208 в течение 15 дней

| Номер собаки | Пол | Показатель         | Сутки опыта |       |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------|-----|--------------------|-------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
|              |     |                    | фон 1       | фон 2 | 3-и  | 7-е  | 14-е | 21-е | 30-е | 45-е | 60-е |
| 1            | ♂   | ЛДГ, Е/л<br>50–495 | 64,0        | 80    | 103  | 80   | 121  | 313  | 120  | 146  | 95   |
| 2*           | ♀   |                    | 76          | 182   | 191  | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 3*           | ♀   |                    | 107         | 167   | 369  | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 4            | ♀   |                    | 49          | 88    | 125  | 147  | 156  | 200  | 93   | 123  | 92   |
| 1            | ♂   | АСТ, Е/л<br>10–55  | 23,2        | 16,1  | 27,1 | 24,9 | 25,0 | 35,7 | 26,7 | 30,2 | 24,0 |
| 2*           | ♀   |                    | 29,2        | 26,2  | 33,2 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 3*           | ♀   |                    | 33,0        | 21,1  | 33,6 | –    | –    | –    | –    | –    | –    |
| 4            | ♀   |                    | 24,9        | 19,0  | 24,7 | 34,0 | 27,1 | 38,6 | 25,9 | 28,3 | 22,8 |

**Примечание.** ЛДГ – лактатдегидрогеназа; АСТ – аспартатаминотрансфераза. \*Собака выведена из эксперимента на 3-и сутки после окончания введения препарата.



**Рис. 4.** Сердце (миокард) собаки № 1, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг, 60-е сутки наблюдения. Структура мышечных волокон не нарушена. Окраска: гематоксилин и эозин, × 400

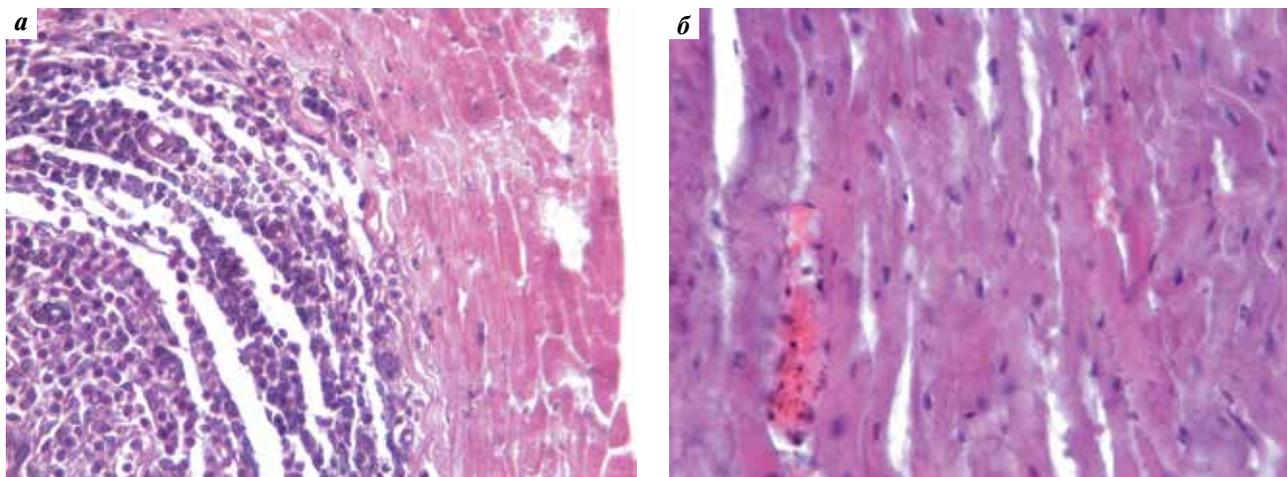
группы с признаками набухания (дистрофии) и гиперэозинофилии (гипоксии). Кроме того, обнаружен инфильтрат, состоящий из лимфоцитов, макрофагов, плазматических клеток и сегментоядерных лейкоцитов. Вблизи инфильтрата выявляются кардиомиоциты с дистрофическими и некробиотическими изменениями. Морфологическая картина соответствует очаговому (межуточному) миокардиту (рис. 5а).

У собаки № 4, получившей препарат в суммарной дозе 30 мг/кг, выявлены качественные изменения ЭКГ: на 7-е сутки наблюдения отмечена инверсия зубца Т и появление глубокого зубца Q, выявленные в I, II стандартных и AVL-отведениях. Отмечено увеличение активности ЛДГ с 3-х по 21-е и на 45-е сутки наблюдения в 1,4–2,3 раза и увеличение активности АСТ на 3-и и 21-е сутки наблюдения

в 1,4 и 1,6 раза по сравнению с фоновыми показателями (см. табл. 3). Морфологически на 60-е сутки наблюдения в стенке миокарда левого желудочка обнаружены отдельные участки гиперэозинофильных кардиомиоцитов с признаками дистрофических изменений (рис. 5б).

Для обобщения и анализа данных проявлений кардиотоксичности, полученных на крысах и собаках, сравнивали эквивалентные по токсичности дозы. При доклиническом токсикологическом исследовании дозы, изученные в хроническом эксперименте на крысах и собаках, охарактеризованы следующим образом: суммарные дозы 50 мг/кг для крыс и 20 мг/кг для собак – как низкие токсические дозы (НТД); суммарные дозы 200 мг/кг для крыс и 30 мг/кг для собак – высокие токсические дозы (ВТД). Суммарная доза для крыс 100 мг/кг охарактеризована как токсическая доза (ТД). При пересчете с мышшиной эффективной терапевтической дозы (25 мг/кг) с использованием видового коэффициента суммарная НТД для крыс превышена в 4 раза, а для собак – в 6 раз [18, 19].

Таким образом, после введения ЛХС-1208 собакам в обеих исследуемых дозах на все сроки наблюдения отмечен синусовый ритм, не отмечено нарушения сердечного ритма, связанного с электрической проводимостью. У 40 % крыс после введения ЛХС-1208 в дозе 50 мг/кг (НТД) на все сроки наблюдения и у 20 % контрольных крыс на 14-е и 30-е сутки наблюдения выявлено нарушение сердечного ритма, расцененное нами как следствие многократного эфирного наркоза. У крыс, получавших препарат в более высоких дозах – 100 (ТД) и 200 мг/кг (ВТД) – не было отмечено нарушения сердечного ритма. Данный факт позволяет предположить, что ЛХС-1208 в этих дозах обладает антиаритмическим действием.



**Рис. 5.** Сердце (миокард) собак, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг: а – собака № 3, 3-и сутки наблюдения. Морфологическая картина очагового (межуточного) миокардита. Окраска: гематоксилин и эозин,  $\times 400$ ; б – собака № 4, 60-е сутки наблюдения. Участок набухших, гиперэозинфильных кардиомиоцитов. Окраска: гематоксилин и эозин,  $\times 400$

Во всех изученных дозах на ЭКГ собак были выявлены незначительные изменения (в пределах физиологической нормы) – увеличение интервалов PQ и интервалов QT. У крыс, получивших препарат в суммарных дозах 50 (НТД) и 200 мг/кг (ВТД), выявлены достоверное увеличение интервалов PQ на 30-е сутки наблюдения и увеличение интервалов QT у крыс, получивших препарат в суммарной дозе 100 мг/кг (ТД) на 3-и сутки наблюдения.

У собак, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг (НТД), препарат вызывал увеличение активности ферментов ЛДГ на 21-е и 45-е сутки наблюдения в 3,9 в 1,8 раза (соответственно) и активности АСТ на 21-е сутки в 1,5 раза по сравнению с фоновыми показателями. У крыс после введения препарата во всех дозах не было выявлено увеличения активности ферментов ЛДГ и АСТ. Морфологических изменений в миокарде собак, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг (НТД), и в миокарде крыс, получивших препарат в суммарной дозе 50 мг/кг (НТД), на всех сроках наблюдения не обнаружено.

У крыс, получивших препарат в суммарной дозе 100 мг/кг (ТД), на 3-и сутки обнаруживаются морфологические изменения: участки кардиомиоцитов с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (ишемии). На 30-е сутки у этих крыс морфологических изменений в миокарде не выявлено.

У 1 собаки, получившей препарат в суммарной дозе 30 мг/кг (ВТД), отмечены увеличение интервала QRS (на 3-и сутки наблюдения), инверсии зубца Т и появление глубокого зубца Q, выявленные в I, II стандартных и AVL отведениях (на 7-е сутки наблюдения), что является признаком кардиотоксичности. Препарат вызывал увеличение активности ЛДГ

у обеих собак, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг с 3-х по 21-е и на 45-е сутки наблюдения, в 1,4–2,3 раза и увеличение активности АСТ на 3-и и 21-е сутки в 1,4 и 1,6 раза у 1 собаки по сравнению с фоновыми показателями.

У собаки, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг (ВТД), на 3-и сутки наблюдения выявлена морфологическая картина очагового (межуточного) миокардита, а на 60-е сутки наблюдения у собаки в миокарде обнаружены участки гиперэозинфильных кардиомиоцитов с признаками дистрофических изменений.

У крыс, получивших препарат в суммарной дозе 200 мг/кг (ВТД), на 3-и сутки наблюдения в миокарде обнаруживаются морфологические изменения: участки кардиомиоцитов с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (ишемии). На 30-е сутки наблюдения сохраняются небольшие дистрофические изменения и гиперэозинофилия некоторых кардиомиоцитов. Отмеченные изменения могут считаться проявлением кардиотоксичности.

### Заключение

Установлено, что новый российский противоопухолевый препарат ЛХС-1208, производное N-гликозида индокарбазола, обладает дозозависимым кардиотоксическим действием, вызывая функциональные изменения сердечно-сосудистой системы крыс во всех изученных дозах, а у собак только в максимальной введенной дозе препарата. Морфологически кардиотоксичность не подтверждена у животных, получивших минимальную исследуемую дозу препарата (НТД), а подтверждена только у животных, получивших максимальную дозу препарата (ВТД).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гершанович Л.Л. Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. М.: Медицина, 1982. С. 89–97. [Gershanovich L. L. Complications of chemotherapy and hormone therapy of malignant tumors. Moscow: Meditsina, 1982. Pp. 89–97 (In Russ.).]
2. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой. 3-е изд., доп. и перераб. М.: Практическая медицина, 2011. С. 435–436. [Guide to chemotherapy of tumor diseases. Ed. N.I. Perevodchikova 3<sup>rd</sup> ed., updated and revised. Moscow: Prakticheskaya Meditsina, 2011. Pp. 435–436 (In Russ.).]
3. Энциклопедия по клинической онкологии: Руководство для практикующих врачей. М.И. Давыдов, Г.Л. Вышковский и др.; под общ. ред. М.И. Давыдова, Г.Л. Вышковского. М.: РЛС-2005, 2004. 1427 с. [Encyclopedia of Clinical Oncology: A Handbook for Practitioners. M.I. Davydov, G.L. Vyshkovsky et al.; Eds. M. I. Davydov, G.L. Vyshkovsky. Moscow: RLS-2005, 2004. 1427 p. (In Russ.).]
4. Тихонова Н.И., Ярцева И.В., Еремина В.А. и др. N-гликозиды индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, обладающие противоопухолевой активностью. Патент № 2548045 Российская Федерация, МПК C07H 19/04, A61P 35/00, A61K 31/7008. Опубл. 10.04.15, Бюл. № 10. 13 с. [Tikhonova N.I., Yartseva I.V., Eremina V.A. et al. N-glycosides indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles with antitumor activity/and others; the applicant and the patent holder Patent No. 2548045 Russian Federation, IPC C07H 19/04, A61P 35/00, A61K 31/7008. Publ. 10.04.15, Bul. № 10. 13 p. (In Russ.).]
5. Горюнова О.В., Апрышко Г.Н., Пугачева Р.Б. и др. Изучение противоопухолевой активности аминокислотных производных индоло[2,3а]карбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):74. [Goryunova O.V., Appleshko G.N., Pugacheva R.B. et al. Study of the antitumor activity of amino acid derivatives of indolo[2,3a]carbazoles. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):74 (In Russ.).]
6. Яворская Н.П., Голубева И.С., Еремина В.А. и др. Изучение противоопухолевой активности индоло[2,3а]карбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):149. [Yavorskaya N.P., Golubeva I.S., Eremina V.A. et al. Study of the antitumor activity of indolo[2,3a]carbazoles. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):149 (In Russ.).]
7. Киселева М.П., Борисова Л.М., Эктова Л.В. и др. Исследование противоопухолевой активности новых соединений в ряду производных гликозидов индолокарбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1S):35. [Kiseleva M.P., Borisova L.M., Ektova L.V. et al. Investigation of the antitumor activity of new compounds in a series of glycoside derivatives of indolocarbazoles. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1S):35 (In Russ.).]
8. Голубева И.С., Яворская Н.П., Еремина В.А. и др. Противоопухолевая активность гликозидов индолокарбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1S):23–24. [Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Eremina V.A. et al. Antitumor activity of glycosides of indolocarbazoles. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1S):23–24 (In Russ.).]
9. Ярцева И.В., Игнатъева Е.В., Дмитричева Н.А. и др. Стандартизация ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):126–7. [Yartseva I.V., Ignatieva E.V., Dmitricheva N.A. et al. Standardization of LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):126–7 (In Russ.).]
10. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола – ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2014;12(3):25–32. [Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A. et al. Development of the technology for the preparation of an injectable dosage form based on the domestic substance of an indolocarbazole derivative – LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;12(3):25–32 (In Russ.).]
11. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение I. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(2):71–77. [Kiseleva M.P., Shprakh Z.S., Borisova L.M. et al. Preclinical study of the antitumor activity of the derivative of N-glycoside indolocarbazole LHS-1208. Message I. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(2):71–77 (In Russ.).]
12. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение II. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(3):41–7. [Kiseleva M.P., Shprakh Z.S., Borisova L.M. et al. Preclinical study of the antitumor activity of the derivative of N-glycoside indolocarbazole LHS-1208. Communication II. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(3):41–7 (In Russ.).]
13. Киселева М.П., Шпрах З.С., Деженкова Л.Г. и др. Действие производного индолокарбазолов ЛХС-1208 на топоизомеразу I. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):89. [Kiseleva M.P., Shprakh Z.S., Dezhenkova L.G. et al. The effect of the derivative of indolocarbazoles LHS-1208 on topoisomerase I. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):89 (In Russ.).]
14. Киселева М.П., Борисова Л.М., Шпрах З.С. и др. Антиметастатическое действие производного индолокарбазолов ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):90. [Kiseleva M.P., Borisova L.M., Shprakh Z.S. et al. Antimetastatic action of the derivative of indolocarbazoles LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):90 (In Russ.).]
15. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного индолокарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):129. [Smirnova Z.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Preclinical study of the antitumor activity of the derivative of indolocarbazole LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(1):129 (In Russ.).]

16. Вартанян А.А., Барышников М.А., Бурова О.С. и др. Блокатор васкулогенной мимикрии восстанавливает чувствительность резистентных клеток меланомы к ДНК-алкилирующим агентам. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2016;27(2):164–71. [Vartanyan A.A., Baryshnikova M.A., Burova O.S. et al. The blocker of vasculogenic mimicry restores the sensitivity of resistant melanoma cells to DNA alkylating agents. Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin Russian cancer research center 2016;27(2):164–71 (In Russ.).]
17. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Изучение «острой» токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства – на основе производного индолокарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(4):59–64. [Nikolina A.A., Kulbachevskaya N.Yu., Konyayeva O.I. et al. The study of the “acute” toxicity of a new antitumor drug – based on the derivative of indolocarbazole LHC-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(4):59–64 (In Russ.).]
18. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Изучение субхронической токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства – гликозидного производного индолокарбазола ЛХС-1208 на крысах. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):62–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-62-69. [Nikolina A.A., Kulbachevskaya N.Yu., Konyayeva O.I. et al. A study of the subchronic toxicity of a new antitumor drug, a glycoside derivative of indolocarbazole LHC-1208 in rats. Russian Biotherapeutic Journal 2016;15(3):62–9 (In Russ.).]
19. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства – гликозидного производного индокарбазола ЛХС-1208. Успехи молекулярной онкологии 2016;3(3):88. [Nikolina A.A., Kulbachevskaya N.Yu., Konyayeva O.I. et al. A preclinical study of the toxicity of a new antitumor drug, the glycoside derivative of indolocarbazole LHC-1208, has been made. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = The successes of molecular oncology 2016;3(3):88 (In Russ.).]
20. Ермакова Н.П., Кульбачевская Н.Ю., Меркулова И. Б и др. Влияние ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему крыс. Сборник тезисов Сеченовского Международного Саммита 2017:59–60. [Ermakova N.P., Kulbachevskaya N.Yu., Merkulova I.B. et al. The influence of LHC-1208 on the cardiovascular system of rats. Theses of the Sechenov International Summit 2017:59–60 (In Russ.).]
21. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. «Субхроническая» токсичность лекарственного средства на основе производного индолокарбазола на крысах. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):99. [Kulbachevskaya N.Yu., Konyayeva O.I., Ermakova N.P. et al. “Subchronic” toxicity of a drug based on an indolocarbazole derivative in rats. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):99 (In Russ.).]
22. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. «Острая» токсичность лекарственного средства на основе производного индолокарбазола (ЛХС-1208) на мелких лабораторных животных. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):100. [Kulbachevskaya N.Yu., Konyayeva O.I., Ermakova N.P. et al. “Acute” toxicity of a drug based on an indolocarbazole derivative (LHC-1208) on small laboratory animals. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):100 (In Russ.).]
23. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Субхроническая токсичность лекарственного средства на основе гликозидного производного индолокарбазола на собаках. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):77. [Nikolina A.A., Kulbachevskaya N.Yu., Konyayeva O.I. et al. Subchronic toxicity of the drug based on the glycoside derivative of indolocarbazole on dogs. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):77 (In Russ.).]
24. Принципы надлежащей лабораторной практики. Национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ 53434–2009). М.: Стандартинформ, 2010. [Principles of Good Laboratory Practice. National Standard of the Russian Federation (GOST 53434–2009). Moscow: Standartinform, 2010. (In Russ.).]
25. Об утверждении Правил лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 1 апреля 2016 г. N 199н. [On approval of the Rules of Laboratory Practice. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation (Ministry of Health and Social Development of Russia) from 01 April 2016 No. 199n (In Russ.).]
26. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002:1–53. [Bolshakov O.P., Neznakov N.G., Babakhanyan R.V. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Qualitative clinical practice 2002:1–53 (In Russ.).]
27. Методические указания по изучению общетоксического действия лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. д. м. н. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Methodical instructions for studying the general toxic effects of drugs. In: Handbook on preclinical drug research. General ed. by Ph.D. A. N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2012. 944 p. (In Russ.).]
28. Михайлова Л.М., Сыркин А.Б., Гарин А.М. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических средств. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общ. ред. чл.-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с. С. 170–204. [Mikhailova L.M., Syrkin A.B., Garin A.M. et al. Methodical instructions for studying the general toxic effect of antitumor pharmacological agents. In: Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Gen. ed. by Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences prof. R.U. Khabriev. 2<sup>nd</sup> ed., updated and revised. Moscow: Meditsina, 2005. 832 p. Pp. 170–204 (In Russ.).]
29. Илларионова В.К., Ипполитова Т.В., Денисенко В.Н. Основы электрокардиографии у собак. Учебное пособие. М.: Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 2004. [Illarionova V.K., Ippolitova T.V., Denisenko V.N. Fundamentals of electrocardiography in dogs. Tutorial. Moscow: K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 2004 (In Russ.).]
30. Мурашко В.В., Струтинский А.В. Электрокардиография. Учебное пособие. 3-е изд., перераб. и доп. М.: МЕДпресс-информ, 1999.

- [Murashko V.V., Strutynskiy A.V. Electrocardiography: a textbook. 3<sup>rd</sup> ed., updated and revised. Moscow: MEDPress-inform 1999 (In Russ.)].
31. Ниманд Х.Н., Сутер П.Ф. Болезни собак. Практическое руководство ветеринарных врачей. М.: Аквариум, 1998. [Nimand H.N., Suter P.F. Diseases of dogs. Practical guidance of veterinarians. Moscow: Aquarium, 1998 (In Russ.)].
32. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1982. [Volkova O.V., Eletskiy Yu.K. Fundamentals of histology with histological technique. 2<sup>nd</sup> ed., updated and revised. Moscow: Meditsina, 1982 (In Russ.)].
33. Грицевская И.Л. Изменения миокарда белых крыс при воздействии пестицида «Кронетон». В сб.: Морфологические методы исследования в гигиене и токсикологии. Сборник науч. тр. М.: Медицина, 1983. С. 11–14. [Gritsevskaya I.L. Changes in the myocardium of white rats under the influence of the pesticide “Croneton”. In: Morphological methods of research in hygiene and toxicology. Coll. of Scientific Works. Moscow: Meditsina, 1983. Pp. 11–14 (In Russ.)].

**ORCID авторов / ORCID of authors**

В.М. Бухман / V.M. Bukhman: <https://orcid.org/0000-0002-7062-798X>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛХТА-2034 ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ

М.И. Трещалин, И.Д. Трещалин, В.А. Голибродо, А.Е. Щекотихин, Э.Р. Переверзева  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»; Россия, 119021  
Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1

Контакты: Михаил Иванович Трещалин [funky@beatween.ru](mailto:funky@beatween.ru)

**Введение.** В ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» создан новый противоопухолевый мультитаргетный препарат ЛХТА-2034, который при пероральном применении проявляет высокую активность в отношении прогностически значимых перевиваемых опухолей мышей.

**Цель исследования** – изучение токсичности ЛХТА-2034 в хроническом эксперименте на крысах при пероральном применении. **Материалы и методы.** В исследовании использовано 30 крыс-самцов линии Wistar. Субстанцию препарата растворяли в питьевой воде и в 2 %-ной концентрации вводили в желудок ежедневно в течение 2 нед в разовых дозах, составляющих 1 и 5 терапевтических (20 и 100 мг/кг соответственно). В ходе исследования определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализ крови, анализ мочи, выполняли электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии. Проводили патоморфологическое исследование внутренних органов.

**Результаты.** Показано, что введение ЛХТА-2034 в разовой дозе, эквивалентной 1 терапевтической, не оказывает влияния на большинство изученных клинико-лабораторных показателей. Только при анализе мочи на 1-е сутки после курса была отмечена гематурия. При микроскопическом исследовании выявлены изменения разной степени выраженности в печени, почках, сердце, желудке, тощей и подвздошной кишке, селезенке и тимусе. Применение ЛХТА-2034 в высокой дозе вызвало гибель 2 животных из 10. У остальных крыс отмечены задержка прироста массы тела, снижение общего количества лейкоцитов и эритроцитов, уровня гемоглобина и величины гематокрита, уменьшение массы тимуса. В моче были найдены эритроциты и нитраты. Гематурия и нитратурия сохранялись в течение 1 мес. У животных, получавших высокую дозу препарата, помимо перечисленных органов повреждающему действию препарата подвергались лимфоузлы, поджелудочная железа, толстая кишка и мозг.

**Заключение.** Выявленные токсические свойства ЛХТА-2034 зависят от величины примененной дозы. При курсовом применении препарата в дозе, эквивалентной 1 терапевтической, они полностью обратимы в течение 30 дней.

**Ключевые слова:** ЛХТА-2034, антрафуран, антрацендион, хроническая токсичность, крысы

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-81-88

## EXPERIMENTAL EVALUATION OF TOXIC PROPERTIES OF LCTA-2034 BY THE ORAL ROUTE OF ADMINISTRATION

M.I. Treschalin, I.D. Treschalin, V.A. Golibrodo, A.E. Shchekotikhin, E.R. Pereverzeva  
Gause Institute of New Antibiotics; Bldg. 1, 11 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119021, Russia

**Introduction.** New antitumor multitarget drug LCTA-2034, obtained in Gause Institute of New Antibiotics, has demonstrated high activity against prognostically significant transplantable mice tumors by the oral application.

**Objective.** To investigate the toxicological properties of LCTA-2034 by the oral route of administration on rats.

**Materials and methods.** Toxicological study of LCTA-2034 was performed on 30 male Wistar rats. Drug substance dissolved in potable water. 2 % solution was administrated per os at the 1 and 5 therapeutic dose (15 × 20 mg/kg or 15 × 100 mg/kg with 24-h interval). During the study dynamics of body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed for all animals. Five animals in each group were sacrificed 1 and 30 days post treatment. The internal organs were subjected to histological evaluation.

**Results.** The results of the study demonstrate that the treatment with low dose of LCTA-2034 does not produce any changes in majority of examined clinical-laboratory parameters with the exception of urinalysis revealed hematuria on day 1 post treatment. Microscopic pathology observation showed structure abnormalities of varying severity in liver, kidneys, heart, stomach, jejunum, ileum, spleen and thymus. Administration of high dose of LCTA-2034 caused mortality of 2 rats in group. The rest of the rats were observed a body weight lag, decrease of total leukocyte and erythrocyte count, hemoglobin and hematocrit level, relative weight of the thymus. Erythrocytes and nitrates were found in urine both on day 1 and on day 30 post treatment. In groups treated with high dose of the drug in addition to the listed above organs damage of the structure of lymph nodes, pancreas, ileum and brain was detected.

**Conclusion.** Revealed toxic properties of LCTA-2034 depended on dose. Multiple administration of 1 therapeutic dose of the drug produces transient toxic effects completely reversible within 30 days.

**Key words:** LCTA-2034, anthrafuran, anthracendione, chronic toxicity, rats

### Введение

В последние десятилетия возможности лечения злокачественных опухолей значительно расширились. В том числе существенно пополнился арсенал противоопухолевых лекарств. В клинической практике появились биотерапевтические средства, направленные на определенные молекулярные мишени, — ингибиторы тирозинкиназ, протеинкиназ, факторов роста и других ферментов и белков и позволяющие контролировать рост опухолей при удовлетворительной переносимости. Многие из этих средств применяются перорально [1]. Пероральные лекарственные формы были созданы и для ряда цитостатиков. Так, один из первых пероральных цитостатиков — анти-метаболит кселода, эффективный при лечении рака желудка, колоректального рака и рака молочной железы, — позволяет провести полный курс химиотерапии в домашних или амбулаторных условиях [2, 3]. Высокая биодоступность позволяет достигать полной или частичной ремиссии при пероральном применении некоторых алкилирующих агентов, противоопухолевых антибиотиков и препаратов других классов. В связи с этим все больше врачей-онкологов стали отдавать предпочтение пероральным химиопрепаратам, поскольку этот путь введения улучшает качество жизни больных и позволяет сократить время их пребывания в клинике [4].

Полученное в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» соединение антрафуран — синтетическое производное антрацендиона [5–7] — хорошо растворимо в биорелевантных средах. С учетом того, что антрациклины и близкие им по структуре антрацендионы — высокоактивные противоопухолевые препараты, широко применяемые для лечения злокачественных опухолей, на основе антрафурана был разработан препарат ЛХТА-2034, проявивший высокую противоопухолевую активность в отношении прогностически значимых перевиваемых опухолей мышей как при парентеральном (внутрибрюшинном), так и при пероральном введении [8, 9]. Кроме того, было показано, что антрафуран обладает способностью одновременно ингибировать топоизомеразы 1,2 и протеинкиназы, а также индуцировать гибель опухолевых клеток различного гистогенеза, включая резистентные линии [7, 9]. С целью создания перорального лекарственного средства было проведено исследование токсических свойств ЛХТА-2034 при данном пути введения.

### Материалы и методы

Работа выполнена в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных

научных целей [10]. Исследования проводились в соответствии с правилами экспериментального изучения оригинальных фармакологических веществ [11].

Крысы самцы линии Wistar массой 150–170 г, полученные из Центрального питомника РАН «Андреевка», после двухнедельного карантина были разделены на группы по 10 голов в каждой. Животные экспериментальных групп получали препарат в разовых дозах, эквивалентных 1 и 5 терапевтическим. При расчете разовых доз для крыс исходили из терапевтических доз (ТД) для мышей, пересчитанных через коэффициент поверхности тела [12]. Они составили 20 мг/кг (1 ТД) и 100 мг/кг (5 ТД). Субстанцию препарата перед введением растворяли в питьевой воде и в 2 %-ной концентрации вводили в желудок при помощи шприца со специальным металлическим зондом ежедневно в течение 2 нед.

В течение исследования ежедневно проводили оценку состояния и поведения животных, 1 раз в неделю определяли массу тела. Перед началом курса введений (сутки 0), на 7, 15, 18, 20, 22, 30 и 45-е сутки опыта при помощи автоматического гематологического анализатора Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия) производили клинический анализ крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоцитарная формула, гематокрит). Для определения указанных показателей кровь брали из хвостовой вены. Биохимическое исследование сыворотки крови животных (аланинаминотрансфераза, аспаратамино-трансфераза, щелочная фосфатаза, креатинин, мочевины, общий билирубин, прямой билирубин, общий белок, альбумин) осуществляли на 1-й и 30-й дни после окончания введения препарата (15-е и 45-е сутки опыта соответственно) при помощи автоматического биохимического анализатора ChemWell (Awareness Technology Inc., США). Исследование суточного диуреза и анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, цилиндры, соли, уробилиноген, удельный вес) животных осуществляли на 1-й и 30-й дни после окончания введения препарата, используя автоматический анализатор мочи Laura Smart (Erba Лахема, Чехия). Электрокардиограмму во 2-м стандартном отведении снимали на 1-е и 30-е сутки после курса (электрокардиограф ЭК1Т-07 («Аксион», Россия)).

Статистическую обработку количественных данных проводили по критерию *t* Фишера–Стьюдента при помощи компьютерных программ StatPlus 2006 и Microsoft Excel. Различия определяли как достоверные при  $p \leq 0,05$ .

На 1-е и 30-е сутки по окончании курса введения препарата по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии, определяли массовые коэффициенты тимуса, сердца, печени, почек, селезенки. Участки внутренних органов фиксировали в 10 %-ном

нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин. Короткие серии срезов окрашивали гематоксилин-эозином и подвергали световой микроскопии.

### Результаты

На всем протяжении эксперимента отклонений в поведенческих реакциях животных не отмечалось. Двухнедельное введение препарата в испытанных дозах не влияло на потребление крысами корма и воды, состояние кожи, видимых слизистых оболочек и шерстного покрова.

Применение препарата в разовой дозе, эквивалентной 1 ТД, гибели животных не вызывало. Они хорошо переносили введения, отмечалась нормальная прибавка массы тела. Препарат, примененный в разовой дозе, равной 5 ТД, к окончанию курса введений вызвал гибель 2 животных из 10 и задержку прироста массы тела у выживших животных, которая сохранялась до конца наблюдения (рис. 1).

При гематологическом исследовании у крыс, получавших препарат в разовой дозе 100 мг/кг, на 1-е и 3-и сутки после окончания курса введений (15-е

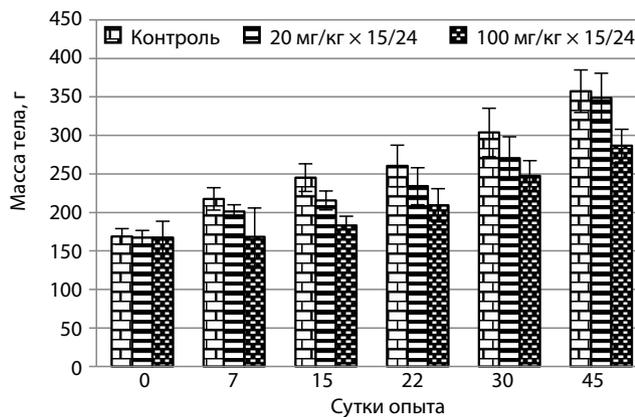


Рис. 1. Динамика массы тела крыс

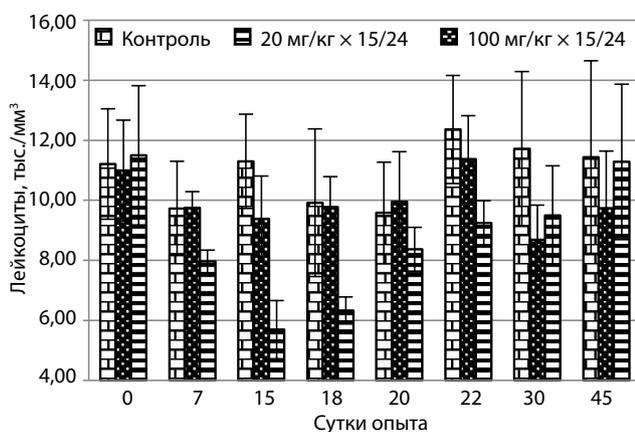


Рис. 2. Динамика общего количества лейкоцитов в периферической крови крыс

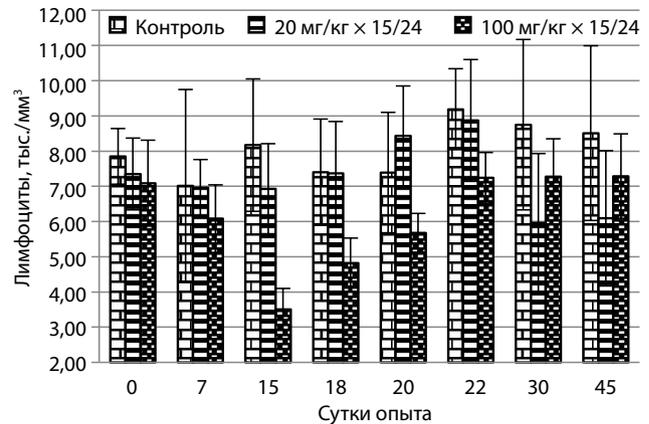


Рис. 3. Динамика количества лимфоцитов в периферической крови крыс

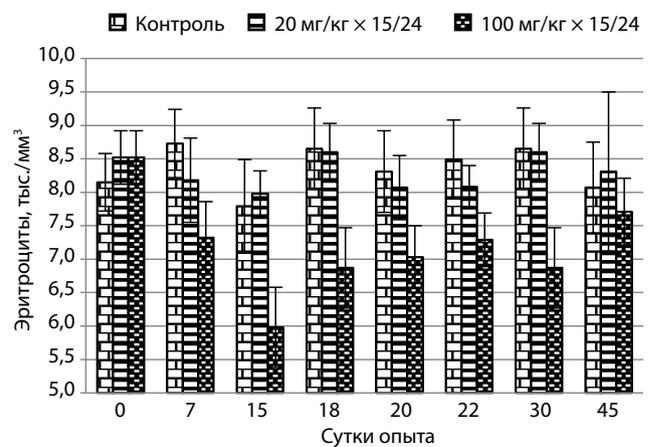


Рис. 4. Динамика количества эритроцитов в периферической крови крыс

и 18-е сутки опыта) было выявлено снижение общего количества лейкоцитов до 5–6 тыс. в  $1 \text{ мм}^3$  (рис. 2), которое происходило за счет лимфоцитопении (рис. 3). Снижение количества эритроцитов и уменьшение содержания гемоглобина были зарегистрированы после 7-го введения, величины гематокрита – на 1-е сутки по окончании введения препарата и сохранялись до 30-х суток эксперимента (рис. 4–6). К концу наблюдения эти показатели восстанавливались до уровня интактного контроля. Количество тромбоцитов оставалось в пределах физиологической нормы. При применении препарата в дозе 20 мг/кг достоверных изменений клинической картины крови не обнаружено.

В результате биохимического исследования сыворотки крови и изучения функции сердца отклонений от нормы не выявлено.

При клиническом исследовании мочи у животных, получавших ЛХТА-2034 в 1 ТД, была отмечена гематурия, которая проявилась на 1-е сутки после курса введений препарата. У животных, получавших высокую дозу ЛХТА-2034, в моче помимо эритроцитов были найдены нитраты. Гематурия и нитратурия

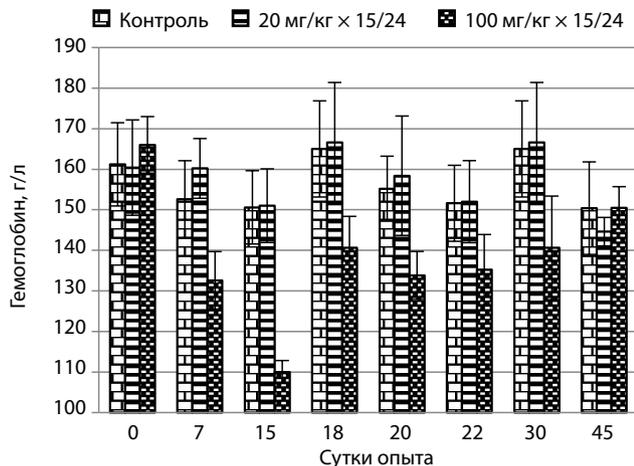


Рис. 5. Динамика содержания гемоглобина в периферической крови крыс

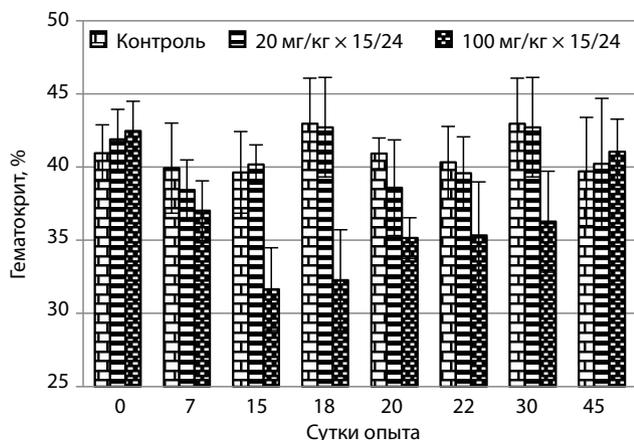


Рис. 6. Динамика величины гематокрита в периферической крови крыс

были обнаружены сразу по окончании курса и сохранялись в течение 1 мес.

Массовые коэффициенты внутренних органов животных, получавших ЛХТА-2034, не отличались от контроля, за исключением тимуса, уменьшение массы которого было выявлено на 1-е сутки после курса введений препарата в разовой дозе 100 мг/кг.

Изучение патологических изменений внутренних органов крыс под действием ЛХТА-2034 показало, что препарат, примененный перорально ежедневно в течение 2 нед в разовой дозе, эквивалентной 1 ТД, вызывает морфологические изменения разной степени выраженности в печени, почках, сердце, желудке, тощей и подвздошной кишке, селезенке и тимусе. При курсовом введении препарата в дозе, превышающей терапевтическую в 5 раз, помимо перечисленных органов повреждающему действию подвергаются также лимфоузлы, поджелудочная железа, толстая кишка и мозг.

При применении ЛХТА-2034 в количестве 1 ТД повреждение ткани печени проявляется в виде мелких очагов некроза в различных зонах (рис. 7а – контроль, 7б).

В почках на фоне сильного периваскулярного отека встречаются единичные мелкие очаги некроза извитых канальцев, которые локализуются вокруг сосудов и клубочков корковой зоны (рис. 8а – контроль, 8б).

В сердце морфологические изменения выражаются в полнокровии сосудов миокарда (рис. 9а – контроль, 9б).

Реакция слизистой оболочки желудочно-кишечного канала на пероральное введение препарата проявляется в виде гиперемии, отека и очаговой деструкции клеточных элементов поверхностных слоев. Так, в желудке отмечаются резкое полнокровие капилляров, атрофия или деструкция покровно-ямочного эпителия и обкладочных клеток, умеренная атрофия слизистой оболочки (рис. 10а – контроль, 10б).

Воздействие ЛХТА-2034 на структуру селезенки выражается в умеренной атрофии лимфоидной ткани фолликулов, тимуса – в умеренной атрофии лимфоидной ткани в корковой и мозговой зонах отдельных долек. Все эти явления полностью обратимы в течение 1 мес.

Пятикратное превышение ТД вызывает намного более глубокие повреждения в органах и тканях, а иногда изменяется и их характер. Так, в печени,

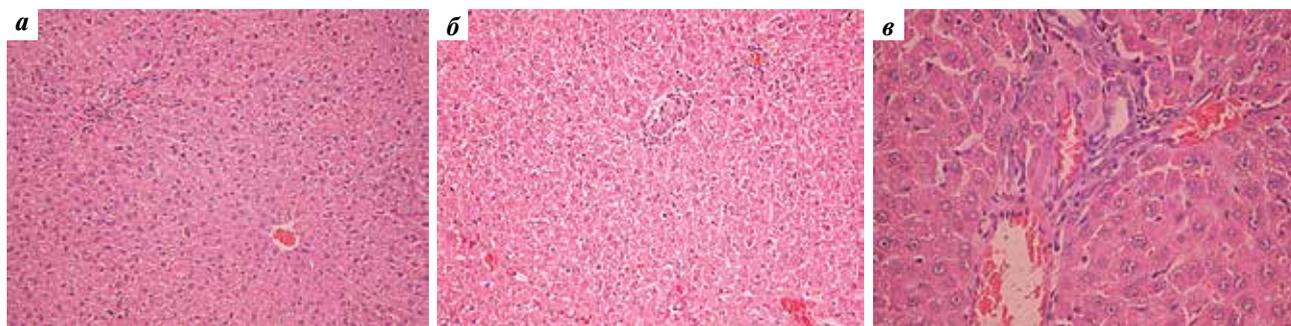
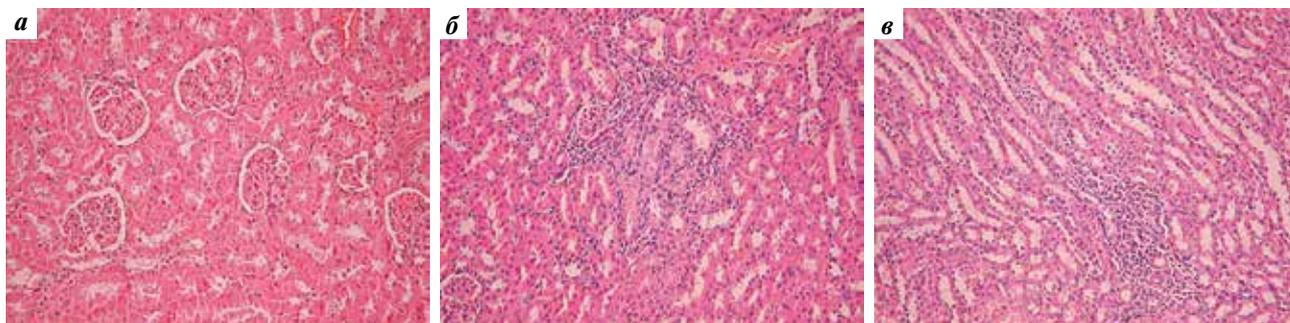
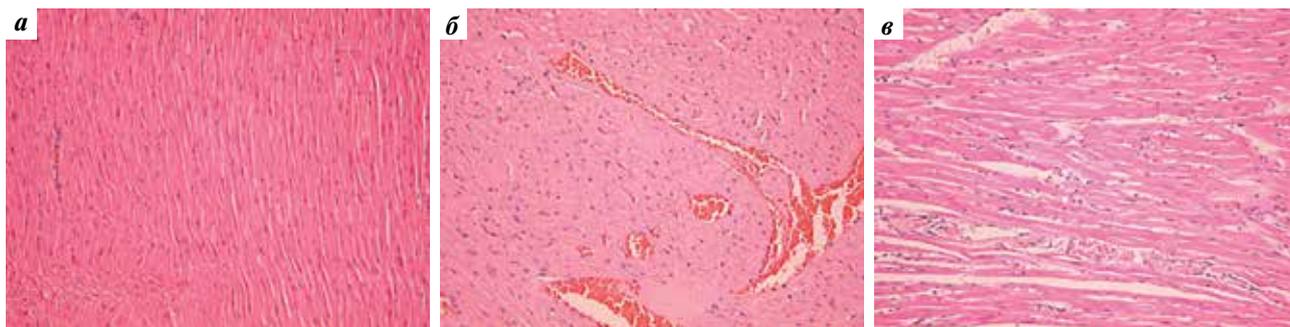


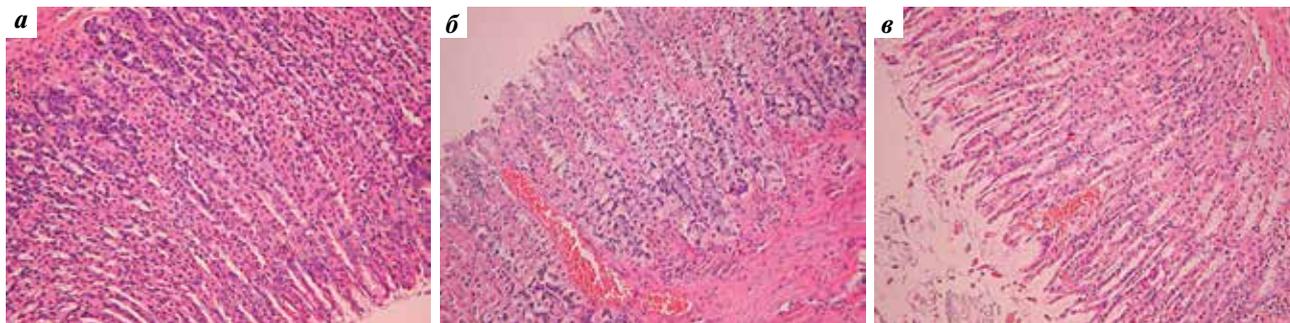
Рис. 7. Печень крысы: а – интактный контроль, × 20; б – ЛХТА-2034, 20 мг/кг × 14. Первые сутки после курса. Очаг микронекроза вблизи портального тракта, × 20; в – ЛХТА-2034, 100 мг/кг × 14. Тридцатые сутки после курса. Жировая дистрофия гепатоцитов вблизи триады, × 40



**Рис. 8.** Почки крысы: а – интактный контроль,  $\times 20$ ; б – ЛХТА-2034, 20 мг/кг  $\times 14$ . Первые сутки после курса. Очаг некроза извитых канальцев вблизи клубочка и сосуда,  $\times 20$ ; в – ЛХТА-2034, 100 мг/кг  $\times 14$ . Первые сутки после курса. Очаг некроза прямых канальцев в мозговой зоне,  $\times 20$



**Рис. 9.** Миокард крысы: а – интактный контроль,  $\times 20$ ; б – ЛХТА-2034, 20 мг/кг  $\times 14$ . Первые сутки после курса. Резкое полнокровие капилляров и венул,  $\times 20$ ; в – ЛХТА-2034, 100 мг/кг  $\times 14$ . Тридцатые сутки после курса. Отек, очаги атрофии мышечных волокон,  $\times 20$



**Рис. 10.** Желудок крысы: а – интактный контроль,  $\times 20$ ; б – ЛХТА-2034, 20 мг/кг  $\times 14$ . Первые сутки после курса. Умеренная атрофия слизистой оболочки, деструкция обкладочных клеток и покровно-язочного эпителия, полнокровие капилляров,  $\times 20$ ; в – ЛХТА-2034, 100 мг/кг  $\times 14$ . Первые сутки после курса. Глубокая атрофия эпителия желез, атрофия, деструкция и десквамация покровно-язочного эпителия, деструкция обкладочных клеток  $\times 20$

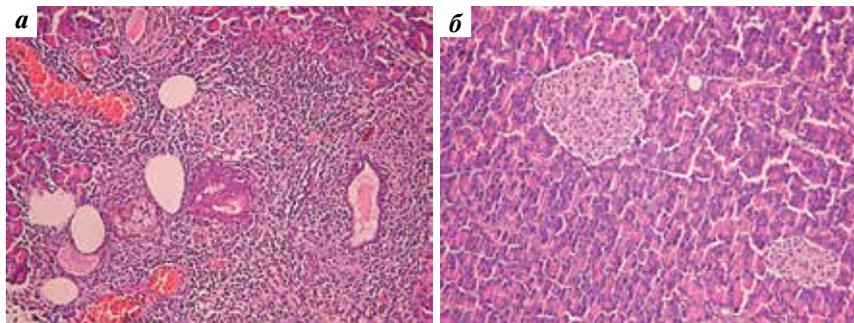
наряду с некрозом ткани, был выявлен апоптоз единичных гепатоцитов. Через 1 мес после курса введенный деструктивные изменения в печени отсутствуют, но в отдельных клетках появляются дистрофические (см. рис. 7в).

При 5-кратном увеличении разовой дозы ЛХТА-2034 резко усиливается повреждающее действие препарата на ткань почек: очаги некроза канальцев возникают не только в корковой зоне, но и в других зонах почки (см. рис. 8в). В отдельных клубочках юкстамедуллярной зоны появляются очаги деструкции капилляров. В течение 1 мес структура почек

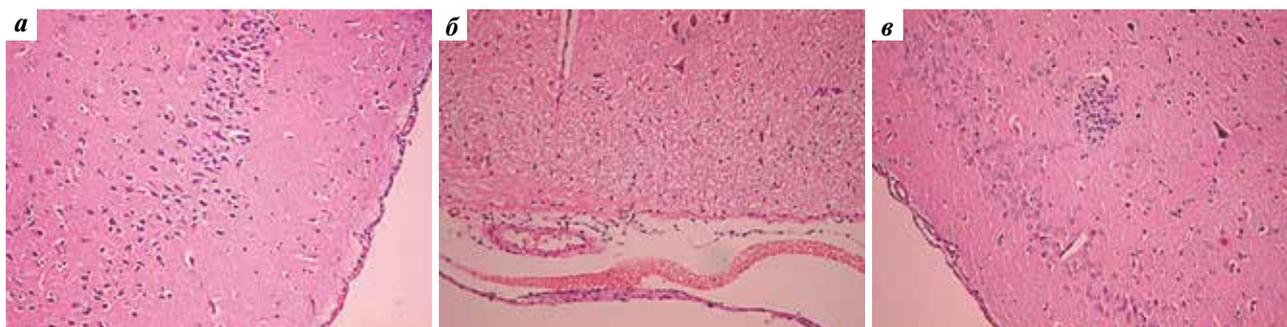
восстанавливается, единичные очаги деструкции подвергаются организации.

Применение высокой дозы ЛХТА-2034 приводит как к гемодинамическим нарушениям, так и к очаговому повреждению миокарда, которое у отдельных животных через 1 мес после курса становится причиной атрофии небольших групп мышечных волокон (см. рис. 9в).

При курсовом пероральном введении высокой дозы также отмечается усиление повреждающего действия препарата на слизистую оболочку желудочно-кишечного канала. В желудке к деструктивным



**Рис. 11.** Поджелудочная железа крысы: а – интактный контроль,  $\times 20$ ; б – ЛХТА-2034, 100 мг/кг  $\times 14$ . Тридцатые сутки после курса. Очаг некроза ацинусов. Некроз желчных протоков. Кисты на месте разрушения протоков. Деструкция клеток в островке Лангерганса,  $\times 20$



**Рис. 12.** Мозг крысы. Большое полушарие: а – интактный контроль,  $\times 20$ ; б – ЛХТА-2034, 100 мг/кг  $\times 14$ . Первые сутки после курса. Набухание и разрыхление мягкой мозговой оболочки, вакуолизация нейронию молекулярного слоя, отек вокруг капилляров наружной пирамидной пластинки, клетки-тени на месте пирамидных нейронов,  $\times 20$ ; в – ЛХТА-2034, 100 мг/кг  $\times 14$ . Первые сутки после курса. Клетки астроглии на месте пирамидных нейронов, микроглиальный узелок в наружной зернистой пластинке, уменьшение количества пирамидных нейронов во внутренней пирамидной пластинке,  $\times 20$

изменениям покровно-ямочного эпителия присоединяется глубокая атрофия слизистой оболочки, которая сохраняется до конца наблюдения (см. рис. 10в). В тощей и подвздошной кишке усиливаются гиперемия, отек и увеличивается объем ткани, подвергающейся деструкции. В течение 1 мес структура слизистой оболочки тощей кишки восстанавливается, в подвздошной сохраняются признаки атрофии. Появляются умеренно выраженные воспалительные реакции в толстой кишке, которые в слабой форме сохраняются до конца эксперимента.

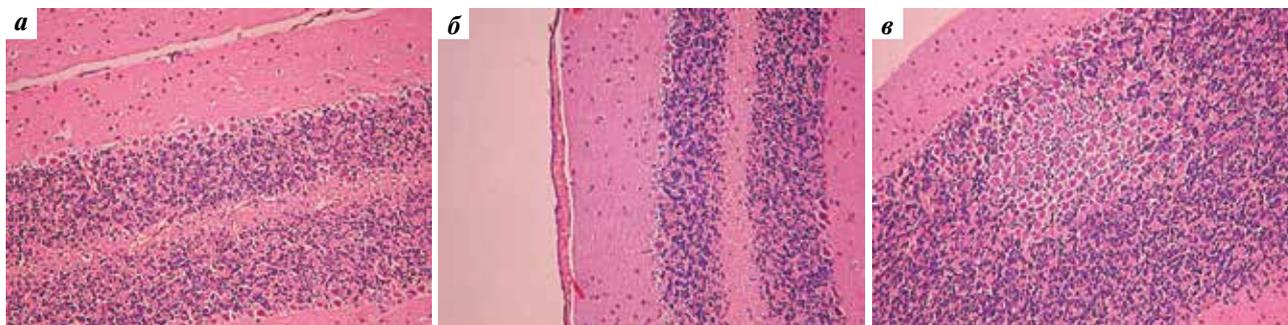
При введении препарата в высокой дозе на 30-е сутки по окончании курса были обнаружены обширные очаги некроза вокруг сосудов и протоков экзокринной части поджелудочной железы (рис. 11). Несмотря на то что эти изменения были выявлены только у 1 животного, они заслуживают особого внимания, так как затрагивают не только ацинусы, но и отдельные желчные протоки, а также сопровождаются деструкцией клеток островков Лангерганса, расположенных в зоне некроза.

Применение препарата в высокой дозе вызывает атрофию лимфоидной ткани. В лимфоузлах она выражена умеренно. В селезенке глубокая атрофия сопровождается активацией экстрамедуллярного

кровообразования, в отдельных долях тимуса она приобретает характер аплазии. Если структура селезенки и лимфоузлов восстанавливается полностью, то в отдельных долях тимуса регенерация лимфоидной ткани происходит на фоне склеротических изменений стромы.

Изучение структуры мозга позволяет утверждать, что при использовании в высоких дозах препарат преодолевает гематоэнцефалический барьер, вызывая токсическую энцефалопатию, морфологические признаки которой наблюдаются в сером и белом веществе больших полушарий и мозжечке. Сразу после курса введений ЛХТА-2034 они проявляются в виде полнокровия сосудов мягкой мозговой оболочки и белого вещества, перикапиллярного отека в сером веществе, дегенеративных изменений отдельных пирамидных нейронов (рис. 12а – контроль, 12б).

Через 1 мес после прекращения введений регистрируются кровоизлияния в мягкой мозговой оболочке больших полушарий и мозжечка. Развивается диффузная атрофия мозговых структур серого вещества, которая выражается в дегенеративных изменениях нейронов, замещении наружного слоя пирамидных нейронов клетками астроглии, формировании микроглиальных узелков в наружной зернистой



**Рис. 13.** *Мозжечок крысы: а – интактный контроль,  $\times 20$ ; б – ЛХТА-2034, 100 мг/кг  $\times 14$ . Первые сутки после курса. Полнокровие капилляров мягкой мозговой оболочки. Разрежение и дегенерация отдельных клеток Пуркинью,  $\times 20$ ; в – ЛХТА-2034, 100 мг/кг  $\times 14$ . Тридцатые сутки после курса. Очаг гиперплазии клеток Пуркинью,  $\times 20$*

пластинке, уменьшении количества пирамидных нейронов во внутренней пирамидной пластинке (см. рис. 12*в*). Наиболее тяжелые изменения локализуются в сером и белом веществе затылочной области.

В мозжечке препарат вызывает дегенерацию, разрежение, а на отдельных участках и выпадение клеток Пуркинью (рис. 13*а* – контроль, 13*б*), которое, по-видимому, компенсируется их очаговой гиперплазией (см. рис. 13*в*).

Сопоставляя клинико-лабораторные и патоморфологические данные, полученные в ходе исследования, можно утверждать, что гастроинтестинальная токсичность ЛХТА-2034 по критерию прироста массы тела выявляется только при введении препарата в высокой дозе. При патоморфологическом исследовании найдены изменения в желудке и отделах кишечника, интенсивность которых зависит от дозы ЛХТА-2034.

Гематотоксические свойства ЛХТА-2034 при курсовом введении в 1 ТД выражены умеренно и регистрируются только при изучении структуры лимфоидных органов. При применении в высокой дозе препарат вызывает транзитное уменьшение числа эритроцитов, содержания гемоглобина, величины гематокрита, а также снижение общего количества лейкоцитов в периферической крови, которое происходит за счет относительной лимфоцитопении. Лимфотоксическое действие препарата подтверждается атрофическими изменениями лимфоидной ткани селезенки, лимфоузлов и тимуса, а также уменьшением массового коэффициента тимуса.

Нефротоксическое действие ЛХТА-2034 определяется как клинически, так и морфологически. При пятикратном превышении ТД оно выражается в повреждении канальцевой и клубочковой системы почек и проявляется в виде длительно сохраняющейся гематурии и нитратурии.

Гепато- и кардиотоксические свойства препарата регистрируются только морфологически. Влияние ЛХТА-2034 на структуру миокарда выявлено у животных, получавших препарат в высокой дозе, и проявляется на позднем сроке наблюдения.

Изучение структуры мозга позволяет утверждать, что при использовании в высокой дозе препарат преодолевает гематоэнцефалический барьер и вызывает токсическую энцефалопатию.

### Заключение

Результаты изучения токсичности ЛХТА-2034 в хроническом эксперименте на крысах позволяют заключить, что препарат обладает гемато-, нефро-, кардио-, гепатотоксическими свойствами, оказывает токсическое действие на пищеварительную систему. В дозе, пятикратно превышающей терапевтическую, ЛХТА-2034 вызывает изменения структуры мозга. Функциональные и морфологические изменения, возникающие под действием ЛХТА-2034, зависят от величины примененной дозы. При курсовом введении препарата в дозе, эквивалентной 1 ТД, они полностью обратимы в течение 30 дней. Это позволяет рекомендовать ЛХТА-2034 для дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману. Под ред. А.Г. Гилмана. Т. 3. М.: Практика, 2006. 488 с. [Goodman and Gilman's clinical pharmacology. Vol. 3. Ed. A.G. Gilman. Moscow: Praktika, 2006. 488 p. (In Russ.)].
2. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой, В.А. Горбуновой. М.: Практическая медицина, 2015. 688 с. [Guidelines for chemotherapy of tumor diseases. Eds. N.I. Perevodchikova, V.A. Gorbunova. Moscow: Prakticheskaya Meditsina, 2015. 688 Pp. (In Russ.)].
3. Cunningham D., Starling N., Rao S. et al. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med* 2008;358(1):36–46. DOI: 10.1056/NEJMoa073149. PMID: 18172173.
4. Decision Resources Survey. Oral chemotherapeutic agents: key success factors and reimbursement issues. A survey of US Oncologists and HMO pharmacy directors. June 2005.
5. Shchekotikhin A.E., Luzikov Y.N., Preobrazhenskaya M.N. et al. 3-aminomethyl derivatives of 4,11-dihydroxynaphtho [2,3-f] indole-5,10-dione for circumvention of anticancer drug resistance. *Bioorg Med Chem* 2005;13(6):2285–91. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.12.044. PMID: 15727877.
6. Shchekotikhin A.E., Glazunova V.A., Dezhenkova L.G. et al. Synthesis and evaluation of new antitumor 3-aminomethyl-4,11-dihydroxynaphtho [2,3-f]indole-5,10-diones. *Eur J Med Chem* 2014;86:797–805. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.021. PMID: 25244612.
7. Shchekotikhin A.E., Dezhenkova L.G., Tsvetkov V.B. et al. Discovery of antitumor anthra[2,3-b]furan-3-carboxamides: Optimization of synthesis and evaluation of antitumor properties. *Eur J Med Chem* 2016;112:114–29. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.050. PMID: 26890118.
8. Щекотихин А.Е., Преображенская М.Н., Синкевич Ю.Б. и др. Цитотоксические линейные гетероциклические производные антрацендиона, содержащие в боковой цепи циклические диамины, активные в отношении опухолевых клеток с множественной лекарственной устойчивостью. Патент РФ № 2412166 от 15.06.2009. [Shchekotikhin A.E., Preobrazhenskaja M.N., Sinkevich J.B. et al. Cytotoxic linear heterocyclic derivatives of anthracenedione having in side chain cyclic diamines, active towards tumour cells with multidrug resistance. Patent RU 2412166 (In Russ.)].
9. Щекотихин А.Е., Синкевич Ю.Б., Деженкова Л.Г. и др. Противоопухолевый антрафурандион и фармацевтические композиции на его основе. Патент РФ № 2554939 от 03.06.15. [Shchekotikhin A.E., Sinkevich J.B., Dezhenkova L.G. et al. Antitumor anthrafurandione and pharmaceutical compositions based on it. Patent RU 2554939 (In Russ.)].
10. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Часть 1. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 13–24. [Guideline for preclinical studies of drugs(part 1). Moscow: Grif i Ko, 2012. P. 13–24 (In Russ.)].
12. Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. *Cancer Chemother Rep* 1966;50(4):219–44. PMID: 4957125.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

## ЗАЩИТА ОБЪЕКТОВ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ В ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА» МИНЗДРАВА РОССИИ В 2017 ГОДУ

О.И. Тарасова, А.А. Рыжова, И.Ю. Кубасова, Н.В. Голубцова, Л.Ю. Гривцова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

### PROTECTION OF INTELLECTUAL PROPERTY IN N.N. BLOKHIN NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER OF ONCOLOGY IN 2017

*O.I. Tarasova, A.A. Ryzhova, I.Yu. Kubasova, N.V. Golubtsova, L.Yu. Gritsova*

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia*

Наличие охраняемых объектов интеллектуальной собственности (ОИС) — изобретений, полезных моделей, товарных знаков, программ для электронно-вычислительных машин (ЭВМ), баз данных является важным показателем инновационной деятельности научно-исследовательской организации и создает правовую основу для внедрения их в практику и дальнейшего коммерческого использования.

За истекший 2017 г. изобретательская активность сотрудников ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России заметно повысилась: подготовлены и поданы в Патентное ведомство (Роспатент) 19 заявок на ОИС, права на которые принадлежат Центру, что в 1,9 раза больше, чем в 2016 г. Среди них 15 заявок на изобретения, 3 — на программы для ЭВМ, 1 — на товарный знак. Подготовлены к подаче 4 заявки на изобретение, продлено действие 1 товарного знака.

Из общего числа заявок на изобретения 6 заявок поданы на клинические способы лечения, 4 — на способы лечения в эксперименте, 2 — на средства для лечения, 1 — на штамм, 1 — на подкожный ксенографт и 1 — на способ анализа соматических мутаций.

Наибольший вклад в создание ОИС внесли сотрудники НИИ клинической онкологии (КО) и НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (ЭДиТО).

В 2017 г. получено 12 охранных документов на ОИС, правообладателем которых является Центр, в том числе 9 патентов на изобретения и 3 свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ.

Из числа 65 действующих патентов, учтенных в качестве нематериальных активов Центра, поддержание 8 патентов было прекращено ввиду невозможности использования в коммерческих целях.

В течение 2017 г. 7 патентов были внедрены в практику, в том числе 4 — в НИИ ЭДиТО, 2 — в НИИ КО и 1 — в НИИ канцерогенеза.

Патент № 2625986 «Способ реконструкции костей таза» (Алиев М.Д., Мусаев Э.Р., Сушенцов Е.В., Софронов Д.И., Валиев А.К., Фокин В.А., Тетюхин Д.В., Колядин С.В., приоритет 11.07.2016, патентообладатели ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и ООО «КОНМЕТ») вошел в базу данных Роспатента «Перспективные изобретения за 2017 г.».

---

Уважаемые читатели!

В предыдущем номере журнала (Российский биотерапевтический журнал 2018;17(2), с. 78) после названия статьи следует читать: Ю.Н. Соловьев. Редакция приносит извинения за допущенную опечатку.



